

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE  
ALIMENTOS (PPGCTA)**

**MARIA JULIA LEDUR ALLES**

**APLICAÇÃO DE PROCESSOS DE SEPARAÇÃO POR MEMBRANAS PARA A  
OBTENÇÃO DE FRUTOOLIGOSSACARÍDEOS FUNCIONAIS A PARTIR DA RAIZ  
DE YACON (*Smallanthus sonchifolius*)**

Porto Alegre

2012

MARIA JULIA LEDUR ALLES

APLICAÇÃO DE PROCESSOS DE SEPARAÇÃO POR MEMBRANAS PARA A  
OBTENÇÃO DE FRUTOOLIGOSSACARÍDEOS FUNCIONAIS A PARTIR DA RAIZ DE  
YACON (*Smallanthus sonchifolius*)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como um dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Dr. Caciano Pelayo Zapata Noreña  
Co-orientadora: Dra. Isabel Cristina Tessaro

Porto Alegre

2012

A435a Alles, Maria Julia Ledur  
Aplicação de processos de separação por membranas para a obtenção de frutooligossacarídeos funcionais a partir da raiz de Yacon (*smallanthus sonchifolius*)/ Maria Julia Ledur Alles. -- Porto Alegre, 2012.

110f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Ciência e Tecnologia de Alimentos. Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2012.

Orientador: Caciano Pelayo Zapata Noreña  
Coorient.: Isabel Cristina Tessaro

#### Bibliografia

1. Yacon 2. Separação por membrana 3. Microestrutura 4. Cristalinidade. I. Título. II. Noreña, Caciano Pelayo Zapata (orient.); Tessaro, Isabel Cristina (coorient.)

CDU 66.01

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos da UFRGS.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIENCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM C&T DE ALIMENTOS/PPGCTA

Autora: MARIA JULIA LEDUR ALLES

Título da dissertação: APLICAÇÃO DE PROCESSOS DE SEPARAÇÃO POR  
MEMBRANAS PARA A OBTENÇÃO DE FRUTOOLIGOSSACARÍDEOS FUNCIONAIS  
A PARTIR DA RAIZ DE YACON (*Smallanthus sonchifolius*)

Dissertação aprovada por:

Prof. Dr. Adriano Brandelli – PPGCTA/UFRGS

Membro da Comissão Julgadora

Profa. Dra. Lígia Damasceno Ferreira Marczak – DEQUI/UFRGS

Membro da Comissão Julgadora

Profa. Dra. Graziela Bruschi Brinques – UFCSPA

Membro da Comissão Julgadora

Prof. Dr. Caciano Pelayo Zapata Noreña – PPGCTA/UFRGS

Orientador

Profa. Dra. Isabel Cristina Tessaro – PPGEQ/UFRGS

Co-orientadora

Prof. Dr. José Maria Wiest

Coordenador do PPGCTA

Prof. Dr. Vitor Manfroi

Diretor do ICTA/ UFRGS

Porto Alegre, 23 de fevereiro de 2012.

## AGRADECIMENTOS

Ao professor Caciano Pelayo Zapata Norenã e ao programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da UFRGS pela oportunidade.

À professora Isabel Cristina Tessaro pelo apoio, orientação e amizade.

Ao Departamento de Engenharia Química da UFRGS pela oportunidade de realização dos experimentos.

À bolsista Danielle Rodrigues da Silva pelo fundamental auxílio na realização dos experimentos e apoio nos momentos difíceis.

Ao doutor Maurício Kipper pelos importantes conhecimentos sobre os processos de separação por membranas repassados ao longo deste trabalho.

Ao professor Eduardo Birnfeld pelo auxílio e paciência na realização das análises cromatográficas.

Ao professor Oscar Perez Lopez pelo apoio na realização e discussão da análise de difração de raios-X.

Aos técnicos do departamento de Engenharia Química, em especial Tatiana Calvete e Marcos Geppert, pelo auxílio na realização dos experimentos e resolução dos diversos problemas.

Aos colegas mestrados e doutorandos, especialmente Júlia, Jordana, Giovana, Voltaire, Renata e Guilherme, pelo apoio, amizade e, principalmente, pelas discussões dos resultados inesperados.

Aos diretores do Centro de Excelência em Tecnologias Avançadas SENAI-CETA, Paulo Antunes de Oliveira Rosa e Márcio Soares Torres, que apoiaram a decisão de cursar o mestrado.

Aos colegas do Setor de Alimentos, Bebidas e Fármacos do SENAI CETA que, durante os últimos dois anos, forneceram suporte e deram seguimento aos projetos durante as minhas ausências.

À colega Alexia Hoppe pela correção do trabalho.

À minha família, em especial meus pais Mário e Jovita e minha irmã Natália, que toleraram as ausências, me apoiaram nos momentos difíceis e me impediram de desistir apesar de todas as dificuldades de conciliar estudo e trabalho, sendo fundamentais para chegar ao fim desta pesquisa.

Ao meu namorado Moysés que, com muito amor e paciência, me deu a força necessária para concluir o mestrado.

## RESUMO

O yacon é uma planta perene originária da região andina, cujas raízes têm recebido atenção devido ao alto teor de frutooligossacarídeos (FOS) prebióticos. Além de proporcionar benefícios à saúde, os FOS apresentam características interessantes como ingredientes alimentícios, sendo utilizados como substitutos do açúcar. Sua extração das raízes de yacon pode ser uma alternativa aos FOS de alto custo atualmente disponíveis comercialmente. O presente trabalho avaliou a tecnologia de separação por membranas para concentração e purificação dos FOS a partir de um extrato obtido da raiz de yacon, mediante o emprego de ultrafiltração (UF) e nanofiltração (NF), com e sem utilização de diafiltração (DF) descontínua. A UF teve como objetivo clarificar o extrato de yacon, removendo partículas em suspensão de alta massa molar e recolhendo os açúcares no permeado. Depois da UF, 63,75 % dos açúcares totais presentes na solução de alimentação inicial foram recuperados no permeado. A NF do permeado, obtido previamente por UF, foi realizada para remover os sais e açúcares simples e concentrar os FOS no retido. O emprego da DF não influenciou a retenção de FOS na NF (que aumentou de 68,78 % sem DF para 70,48 % com DF), mas diminuiu a retenção de glicose de 40,63 para 31,61 % e de frutose de 25,64 para 18,69 %, permitindo uma maior purificação dos FOS no retido. Após o processo combinado de UF-NF, 51,85 % dos FOS da solução inicial foram recuperados no retido da nanofiltração, alcançando pureza de 19,75%. A seguir, o retido obtido na nanofiltração associada à diafiltração foi liofilizado. Nesse produto liofilizado foram analisadas cor, atividade de água ( $a_w$ ), microestrutura – por meio de microscopia eletrônica de varredura acoplada a espectroscopia por energia dispersiva de raios-X (MEV-EDS) – e cristalinidade – através de difração de raios-X. O teor de açúcares do produto liofilizado foi 19,75 % de FOS, 36,66 % de glicose e 43,59 % de frutose, em massa, com  $a_w$  de 0,284. A sua aparência externa foi a de um pó granulado e esbranquiçado, cujos parâmetros de cor, no sistema CIELAB, foram de  $76,25 \pm 1,19$ ,  $-1,03 \pm 0,09$  e  $1,02 \pm 0,03$  para  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$  respectivamente. A amostra se mostrou altamente higroscópica e com tendência à aglomeração, confirmada pela visualização da formação de pontes entre partículas adjacentes nas imagens do MEV. Não foram identificados picos nos difratogramas de raios-X, indicando características amorfas. Entretanto, a alta higroscopicidade da amostra, que levou à formação de uma massa rígida e contínua, pode ter dificultado a correta difração de raios-X.

Palavras-chave: Yacon; frutooligossacarídeos; separação por membranas; microestrutura; cristalinidade

## ABSTRACT

Yacon is a perennial plant originated from the Andean region which roots have been receiving increased attention due to their high content in prebiotic fructooligosaccharides (FOS). Apart from promoting many health benefits, FOS present interesting characteristics as food ingredient, being used as sugar substitute, and its extraction from yacon roots may be an alternative to the high costs FOS actually commercially available. The present work evaluated membrane technology for concentrating and purifying FOS from an extract obtained from yacon roots, combining a first ultrafiltration (UF) clarifying step with nanofiltration (NF), with and without association with discontinuous diafiltration (DF). UF aimed to remove large molecules such as proteins and suspended solids, yielding a saccharide-rich permeate. After UF, 63.75 % of total saccharides from the initial feed were recovered in the permeate, that was then subjected to NF in order to reduce glucose, fructose and salts content and concentrate the oligosaccharides in the retentate. DF did not largely influenced FOS retention in NF (it increased from 68.78 % without DF to 70.48 % with DF), but decreased glucose and fructose retentions, from 40.63 to 31.61 % and 25.64 to 18.69 %, respectively, allowing a greater purification of FOS in the retentate. After the combined UF-NF process, 51.85 % of FOS from the initial feed were recovered in the NF final retentate, with 19.75 % purity. After this, the final retentate of nanofiltration associated with diafiltration was lyophilized and the powder was subjected to analyses of color, water activity ( $a_w$ ), microstructure – by Scanning Electron Microscopy coupled to Energy-dispersive X-ray Spectroscopy (SEM-EDS) – and crystallinity – by X-ray diffraction. The obtained freeze-dried FOS-enriched saccharides powder, containing 19.75 % of FOS, 36.66 % of glucose and 43.59 % of fructose, in weight, was a whitish granulated powder, with  $a_w$  of 0.284 and CIELAB color coordinates  $L^*$ ,  $a^*$  and  $b^*$  of  $76.25 \pm 1.19$ ,  $-1.03 \pm 0.09$  and  $1.02 \pm 0.03$ , respectively. It was highly hygroscopic and with agglomeration tendency, confirmed by the formation of bridges between particles on the SEM images. No peaks were identified at X-ray diffractograms, indicating its amorphous characteristics. However, the sample high hygroscopicity and the formation of a rigid mass may have hindered a trustable X-ray analysis.

**Keywords:** Yacon; fructooligosaccharides; membrane technology; microstructure; crystallinity

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 1

Figura 1 - Estrutura química das frutanas .....	16
Figura 2 - Raízes de yacon cultivadas pela EMATER em Erechim, RS.....	25
Figura 3 - Representação esquemática de um sistema de duas fases separado por uma membrana.....	30
Figura 4 - Velocidade relativa de reações em função da atividade de água.....	36
Figura 5 - Coordenadas do sistema CIEL*a*b*.....	38

### CAPÍTULO 2

Figure 1 - Schematic representation of the membrane bench scale Unit .....	47
Figure 2 - Water and yacon extract fluxes versus transmembrane pressure.....	52
Figure 3 - Water permeate fluxes ( $J_p$ ) versus transmembrane pressure before and after yacon extract ultrafiltration and after cleaning procedure for UF-10 membrane.....	53
Figure 4 - Water permeate fluxes ( $J_p$ ) versus transmembrane pressure before and after yacon extract ultrafiltration and after cleaning procedure for UF-30 membrane.....	54

### CAPÍTULO 3

Figure 1 - Schematic representation of the membrane bench scale unit.....	72
Figure 2 - FOS-enriched saccharides powder.....	75
Figure 3 - Electron microscopy images of yacon FOS-enriched powder and of commercial chicory FOS.....	76
Figure 4 - X-ray diffractograms of experimental yacon FOS-enriched saccharides powder.....	80
Figure 5 - X-ray diffractograms of commercial chicory roots FOS .....	80

### CAPÍTULO 4

Figura 1 - Imagens de microscópio eletrônico de varredura da amostra liofilizada proveniente do yacon e dos FOS comerciais atomizados oriundos da chicória, com aumentos de x250.....	95
---	----



## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 1

Tabela 1 - Inulina e FOS em plantas e vegetais utilizados na alimentação humana.....	15
Tabela 2 - Massas molares dos açúcares simples e frutooligosacarídeos.....	16
Tabela 3 - Resumo das aplicações dos frutooligosacarídeos na indústria de alimentos.....	22
Tabela 4 - Composição de raízes de yacon frescas indicada na literatura.....	26
Tabela 5 - Resumos das características dos principais processos de separação por membranas.....	31

### CAPÍTULO 2

Table 1 - Characteristics of the membranes used in UF and NF experiments.....	46
Table 2 - Yacon juice, liquid extract from ground roots and yacon extract characteristics: pH, soluble solids (°Brix) and saccharides content (g per 100 g dry matter) .....	50
Table 3 - Membrane fouling (%) and water flux recovery (%) for UF-10 and UF-30 membranes with different pre-treatment filters.....	55
Table 4 - Concentration of fructooligosaccharides, glucose and fructose at the feed, permeate and retentate and saccharides observed retention in the yacon extract ultrafiltration using the UF-10 and UF-30 membranes.....	56
Table 5 - Saccharides retention for UF-10 and UF-30 membranes with different yacon extract pre-treatment filters.....	56
Table 6 - pH, electrical conductivity and soluble solids at the feed, permeate and retentate of the UF-10 and UF-30 experiments, using 1 µm pre-filtered yacon extract.....	57
Table 7 - Concentration of fructooligosaccharides, glucose and fructose at the feed, permeate and retentate and saccharides observed retention in the nanofiltration step using the NF-1 membrane with and without diafiltration.....	58
Table 8 - pH, electrical conductivity and soluble solids at the feed, permeate and retentate of the NF-1 experiments.....	60
Table 9 - Mass balance throughout the ultrafiltration and nanofiltration process, without and with diafiltration: Saccharides yield (g.kgyacon-1), mass (g) and purity (%) in feed, permeate and retentate fractions.....	61

### CAPÍTULO 3

Table 1 - Atomic composition (weight %) obtained by energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDS) in experimental FOS-enriched powder and commercial chicory FOS.....	78
--	----

### CAPÍTULO 4

Tabela 1 - Características do suco de yacon, do líquido extraído das raízes lixiviadas e do extrato de yacon: pH, sólidos solúveis (°Brix) e teor de açúcares (g/100g matéria seca).....	89
Tabela 2 - Formação de fouling e retenção de FOS, glicose e frutose para as membranas UF-10 e UF-30 com os pré-filtros de 1 e 22 µm.....	92

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO 1</b> .....	<b>11</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>12</b>
1.1 ALIMENTOS FUNCIONAIS .....	12
1.2 PREBIÓTICOS .....	14
1.3 INULINA E FRUTOOLIGOSSACARÍDEOS .....	15
1.3.1 Propriedades nutricionais e efeitos fisiológicos dos FOS .....	17
1.3.2 Propriedades tecnológicas dos FOS.....	20
1.3.3 Produção comercial da inulina e dos FOS.....	23
1.4 YACON ( <i>Smallanthus sonchifolius</i> ) .....	24
1.4.1 Composição química e teor de fructooligosacarídeos do yacon.....	25
1.4.2 Escurecimento enzimático do yacon.....	27
1.4.3 Processos de extração de inulina e fructooligosacarídeos.....	28
1.5 PROCESSOS DE SEPARAÇÃO POR MEMBRANAS (PSM) .....	29
1.5.1 Aplicação dos PSM na indústria de alimentos .....	33
1.5.2 Aplicação dos PSM na purificação de oligossacarídeos .....	34
1.6 CARACTERÍSTICAS DOS FRUTOOLIGOSSACARÍDEOS EM PÓ.....	35
1.6.1 Atividade de água.....	36
1.6.2 Cor.....	37
1.6.3 Microestrutura .....	38
1.6.4 Cristalinidade .....	39
1.7 OBJETIVO GERAL.....	41
1.8 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	41
<b>CAPÍTULO 2</b> .....	<b>42</b>
<b>Concentration and purification of yacon (<i>Smallanthus sonchifolius</i>) roots     fructooligosaccharides using membrane technology.....</b>	<b>43</b>
<b>CAPÍTULO 3</b> .....	<b>67</b>
<b>Physicochemical characterization of fructooligosaccharides-enriched     saccharides powder obtained from yacon roots (<i>Smallanthus sonchifolius</i>) by     membrane technology .....</b>	<b>68</b>
<b>CAPÍTULO 4</b> .....	<b>87</b>
<b>DISCUSSÃO GERAL</b> .....	<b>88</b>
<b>SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS</b> .....	<b>977</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>978</b>
<b>ANEXO A - PROTOCOLO DE LIMPEZA DAS MEMBRANAS</b> .....	<b>109</b>

## **CAPÍTULO 1**

### **INTRODUÇÃO**

## 1. INTRODUÇÃO

Neste capítulo será apresentada uma revisão da literatura sobre os alimentos funcionais, com ênfase nos benefícios nutricionais da inulina e dos frutooligossacarídeos (FOS). Em seguida serão abordadas as características do yacon (*Smallanthus sonchifolius*), uma raiz tuberosa originária da região andina que vem sendo cultivada no Brasil desde 1990 e destaca-se pelo elevado teor de FOS, bem como algumas técnicas de extração desses sacarídeos. Será realizada uma revisão sobre os processos de separação por membranas e suas aplicações na indústria de alimentos e na purificação de oligossacarídeos. Por último, serão discutidas algumas características que afetam as propriedades tecnológicas dos produtos em forma de pó, como atividade de água, microestrutura e cristalinidade.

### 1.1 ALIMENTOS FUNCIONAIS

As mudanças na sociedade atual e nos padrões de consumo exercem grande influência na indústria de alimentos, que vem sendo solicitada a oferecer alimentos mais saudáveis e que se adaptem ao ritmo acelerado de vida. Com acesso rápido e facilitado a informações técnicas através da internet, cada vez mais consumidores acreditam que os alimentos influenciam diretamente na sua saúde e estão mais conscientes da necessidade de ingerir dietas pobres em gordura saturada e ricas em vegetais, frutas e cereais integrais. Deste modo, a alimentação não tem mais como único objetivo fornecer os nutrientes básicos, mas também prevenir doenças relacionadas à nutrição, tais como câncer, osteoporose, diabetes tipo 2 e doenças coronárias, e melhorar o bem-estar físico e mental dos consumidores (SIRÓ et al., 2008; BETORET et al., 2011).

Esta demanda por alimentos mais saudáveis pode ser explicada pelos altos custos com os serviços de saúde, pelo aumento da expectativa de vida e pelo desejo da população idosa de consumir produtos que melhorem a sua qualidade de vida (KAPSACK et al., 2011). Além disso, a diminuição do tempo livre para o preparo de refeições exige alimentos prontos para o consumo, que auxiliem na manutenção da saúde.

Os progressos nos estudos científicos suportam a evidência de que, além de fornecer nutrição, a dieta pode modular várias funções do corpo que são importantes para a saúde. Assim, estudos epidemiológicos indicam que regimes alimentares ricos em alimentos de origem vegetal agem na prevenção de doenças degenerativas, especialmente através de seu

conteúdo de fibras e de substâncias com características antioxidantes que estimulam as defesas do organismo, resultando no aumento da proteção contra as agressões por radicais livres e na regulação dos estados de pós-menopausa (COZZOLINO; ANGELIS, 2004). Ademais, técnicas inovadoras em ciência e tecnologia de alimentos permitem identificar e isolar compostos fisiologicamente ativos em produtos de origem vegetal e animal e assim melhorar a composição e a qualidade dos alimentos.

Os alimentos que possuem propriedades de reduzir o risco de doenças crônicas e melhorar a saúde são conhecidos como alimentos funcionais. Este conceito foi introduzido pelo governo do Japão nos anos 1980, durante a implementação de um sistema regulatório para aprovar certos alimentos com efeitos benéficos à saúde na tentativa de reduzir os gastos com saúde pública, considerando a elevada expectativa de vida naquele país (STRINGHETA et al., 2007).

Alimentos funcionais, de acordo com a Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde, são aqueles que, além das funções nutricionais básicas, quando consumidos em dieta usual, produzem efeitos metabólicos e fisiológicos benéficos à saúde, devendo ser seguros para consumo, sem supervisão médica (BRASIL, 1999). Devem ser alimentos ou ingredientes convencionais, que façam parte da alimentação usual, e não pílulas ou cápsulas. A funcionalidade deve ocorrer naturalmente nos alimentos e possuir efeitos benéficos comprovados cientificamente (ROBERFROID, 2007a). Alguns exemplos de ingredientes funcionais são os prebióticos e probióticos, fibras, vitaminas, antioxidantes, compostos fenólicos e ácidos graxos poliinsaturados (MORAES; COLLA, 2006).

Entre as propriedades dos alimentos funcionais pode-se citar a regulação das funções gastrintestinais, incluindo aquelas que controlam o tempo do trânsito intestinal; a motilidade intestinal; a proliferação celular da mucosa do intestino; a microbiota do intestino grosso; a atividade imunológica; o balanço mineral através do intestino (principalmente cálcio e magnésio) e as alterações no perfil lipídico promovidas pela digestão dos nutrientes. Estes benefícios podem ser obtidos por meio da ingestão de prebióticos e probióticos, que mantêm o equilíbrio da microbiota intestinal (ROBERFROID, 2000).

Entre 1998 e 2003, as vendas globais de alimentos funcionais aumentaram quase 60 %, e, em 2008, a elevação foi de quase 40 %. O mercado mundial de alimentos funcionais atingiu 33 bilhões de dólares no ano 2000, enquanto que, em 2005, este valor já alcançava 73,5 bilhões. Após 2010, esperava-se atingir um mercado de 167 bilhões de dólares, com crescimento anual de 10 % (GRANATO et al., 2010). No Brasil, as vendas de alimentos funcionais (dos quais 65 % são probióticos) atingiram 500 milhões de dólares em 2004,

representando quase um por cento do total das vendas de alimentos processados. À época, esperava-se um crescimento anual de 4,5 a 5 % (CRUZ; FARIA; VAN DENDER, 2007).

## 1.2 PREBIÓTICOS

Entre os alimentos funcionais, os prebióticos, probióticos e simbióticos vêm recebendo grande atenção por sua influência na fisiologia do cólon e na composição e atividade da sua microbiota, que afetam a saúde do hospedeiro. O equilíbrio da microbiota intestinal é muito importante na prevenção da colonização e multiplicação de bactérias patogênicas no intestino, além de fornecer outros benefícios, como aumento da tolerância à lactose, propriedades antitumorais, neutralização de certas toxinas, estímulo do sistema imune intestinal e, possivelmente, redução dos níveis lipídicos no sangue (HAULY; MOSCATO, 2002).

O conceito de prebióticos vem evoluindo ao longo do tempo. Segundo a definição inicial, de Gibson e Roberfroid (1995), eles eram considerados ingredientes alimentícios não-digeríveis que afetam benéficamente a saúde do hospedeiro por estimular a multiplicação e a atividade de um número limitado de bactérias presentes no cólon. A literatura recente, entretanto, não restringe o cólon como único sítio ativo e define prebiótico como um ingrediente fermentado seletivamente por algumas bactérias, permitindo alterações específicas na composição e na atividade da microbiota gastrintestinal e promovendo benefícios à saúde e ao bem-estar do hospedeiro (ROBERFROID, 2007b; FIGUEROA-GONZÁLEZ et al., 2011). Se os prebióticos forem ingeridos em conjunto com bactérias probióticas, produzem o efeito simbiótico, promovendo a sobrevivência e a multiplicação de novas linhagens probióticas no cólon.

Para ser considerado prebiótico, um ingrediente deve possuir três características: (i) ser resistente à digestão, (ii) ser fermentado pela microbiota intestinal e (iii) estimular seletivamente a microbiota que promove efeitos benéficos ao hospedeiro. A maioria dos prebióticos são carboidratos de cadeia curta com grau de polimerização (GP) de dois ou mais, que não são suscetíveis à digestão pelas enzimas pancreáticas (FIGUEROA-GONZÁLEZ et al., 2011). Entre os prebióticos encontram-se a inulina e as oligofrutoses, também chamadas de frutooligosacarídeos e abreviadas como FOS.

### 1.3 INULINA E FRUTOOLIGOSSACARÍDEOS

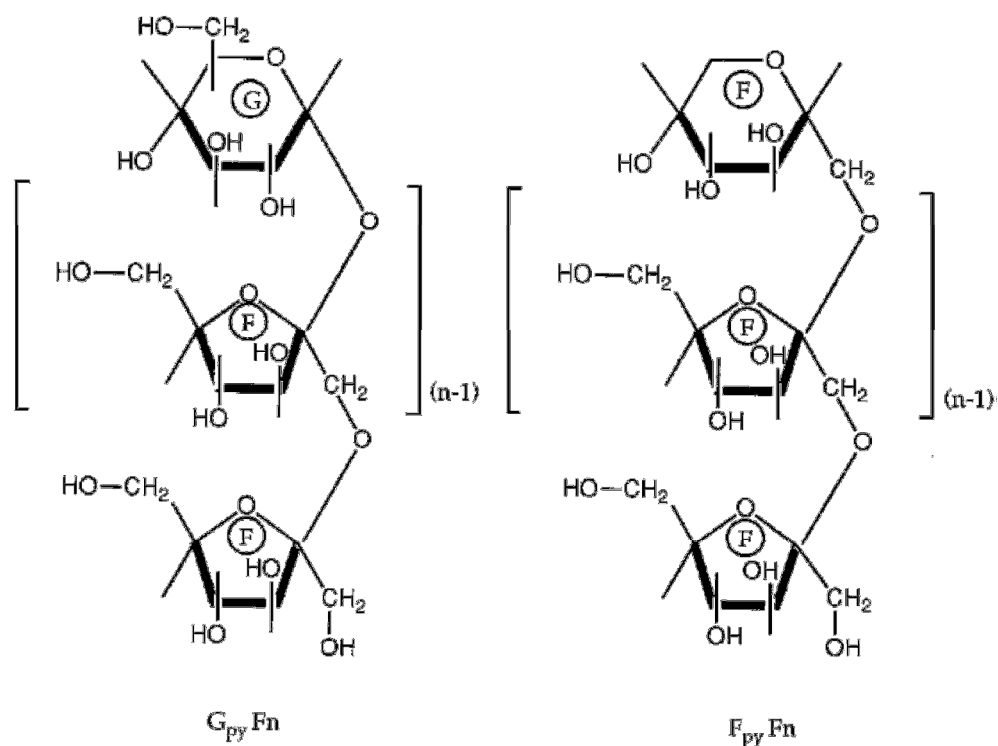
A inulina e os frutooligossacarídeos (FOS) são polímeros e oligômeros de frutose que pertencem ao grupo das frutanas, unidos por ligações  $\beta(2\rightarrow1)$ . São carboidratos de reserva encontrados em mais de 36.000 espécies de plantas e estão presentes em grandes quantidades em produtos como cebola, alho, alcachofra, chicória e yacon (Tabela 1). Deste modo, são ingredientes alimentícios naturais, e estima-se que europeus e norte-americanos consumam entre 3-11 g e 1-4 g de inulina ou FOS por dia, respectivamente (ROBERFROID, 2007a).

**Tabela 1** - Inulina e FOS (% massa fresca) em plantas e vegetais utilizados na alimentação humana

<i>Plantas</i>	<i>Parte comestível</i>	<i>Inulina</i>	<i>FOS</i>
Cebola	Bulbo	1,1-7,5	1,1-7,5
Alcachofra de Jerusalém	Tubérculo	16-20	10-15
Alcachofra	Folhas centrais	3-10	<1
Chicória	Raiz	15-20	5-10
Alho-Porró	Bulbo	3-10	2,4-8,0
Alho	Bulbo	9-16	3,6-6,4
Banana	Fruta	0,3-0,7	0,3-0,7
Centeio	Cereal	0,5-1	0,5-1
Cevada	Cereal	0,5-1,5	0,5-1,5
Dente de leão	Folhas	12-15	NA
Yacon	Raiz	3-19	3-19
Aspargos	Broto	2-3	2-3
Trigo	Cereal	1-4	1-4

Fonte: Adaptado de Haully e Moscato (2002); Boeckner; Schnepf e Tunglund (2001)

Quimicamente, eles são carboidratos lineares polidispersos, podendo ser divididos em dois grupos:  $F_{py}F_n$  [frutopiranosil-(frutofuranosil) $n$ -frutose] ou  $G_{py}F_n$  [glicopiranosil-(frutofuranosil) $n$ -frutose], quando possuírem uma molécula de glicose no final da cadeia linear de frutose, unida por uma ligação  $\alpha(1\rightarrow2)$ , como na molécula de sacarose (ROBERFROID, 2007a). Como a inulina e os FOS são misturas de polímeros e oligômeros, eles são melhor caracterizados pelo seu grau de polimerização (GP). Moléculas com GP entre 3 e 10 são consideradas FOS, enquanto que as com GP entre 10 e 65 são conhecidas como inulina (KOLIDA; GIBSON, 2007). Esta estrutura química, ilustrada na Figura 1, é a responsável pelas interessantes propriedades nutricionais e tecnológicas destas moléculas.

**Figura 1** - Estrutura química das frutanas

Fonte: Roberfroid e Delzenne (1998)

Nota: G e F representam glicose e frutose, respectivamente.

As massas molares de glicose, frutose, sacarose e frutooligossacarídeos estão especificadas na Tabela 2.

**Tabela 2** - Massas molares dos açúcares simples e frutooligossacarídeos

Sacarídeo	Massa molar (Da)
Glicose	180
Frutose	180
Sacarose	342
GF <sub>2</sub>	540
GF <sub>3</sub>	720
GF <sub>4</sub>	900
GF <sub>5</sub>	1080
GF <sub>6</sub>	1260
GF <sub>7</sub>	1440
GF <sub>8</sub>	1620
GF <sub>9</sub>	1800
GF <sub>10</sub>	1980

Fonte: Kuhn (2010)



### 1.3.1 Propriedades nutricionais e efeitos fisiológicos dos FOS

O efeito prebiótico da inulina e dos FOS ocorre devido à configuração  $\beta$  do C<sub>2</sub> anomérico nos monômeros de frutose, que torna estas moléculas resistentes à hidrólise pelas enzimas digestivas da parte superior do trato gastrointestinal humano, que são específicas para ligações  $\alpha$ -glicosídicas. Estas características conferem a classificação de sacarídeos não-digeríveis aos FOS (ROBERFROID, 2007a). Seu consumo foi relacionado ao aumento de funções como digestão e metabolismo da lactose, reciclagem de compostos como o estrógeno e produção de compostos imuno-estimulantes. Outros benefícios são o auxílio da restauração da microbiota intestinal normal durante terapia com antibióticos e a diminuição do crescimento de bactérias nocivas, com consequente redução da produção de toxinas e compostos carcinogênicos por estas bactérias. Os FOS podem ainda ser associados à diminuição da potencialidade de várias patologias humanas normalmente associadas com o alto número de bactérias intestinais patogênicas, como doenças autoimunes, câncer, acne, cirrose hepática, constipação, intoxicação alimentar, diarreia associada a antibióticos, problemas digestivos, alergias, intolerâncias a alimentos e gases intestinais (PASSOS; PARK, 2003). Outros atributos e benefícios atribuídos aos FOS serão descritos a seguir.

#### 1.3.1.1 Fermentação e baixo valor calórico

Os FOS vêm sendo utilizados em várias aplicações para substituir açúcar e reduzir o valor calórico de alimentos como sorvete, lácteos e de panificação. Eles possuem baixas calorias porque não são metabolizados, atingindo o cólon, onde são totalmente fermentados pela microbiota. A energia produzida pela fermentação é resultado da produção de lactato e de ácidos graxos de cadeia curta, como acetato, propionato e butirato, relacionados à redução do risco de desenvolvimento de distúrbios gastrointestinais, câncer e doenças cardiovasculares (NINESS, 1999; WONG; JENKINS, 2007). Estes ácidos são metabolizados e contribuem com 1,5 kcal/g de FOS. Outros subprodutos da fermentação incluem biomassa bacteriana e gases, como hidrogênio, metano e dióxido de carbono, que são excretados.

Outro importante atributo nutricional dos FOS é a sua ação semelhante à das fibras alimentares, que podem ser definidas como resíduos de origem vegetal não-digeríveis pelas enzimas alimentares humanas. As definições recentes diferenciam as fibras inerentes da parede celular de plantas das fibras isoladas ou sintéticas. Para as últimas serem consideradas fibras, elas devem possuir efeitos fisiológicos benéficos comprovados, como efeito laxativo e

atenuação dos níveis sanguíneos de colesterol e glicose (WEICKERT; PFEIFFER, 2008; RANINEN et al., 2011). A ingestão diária recomendada de fibras para adultos é de 14 g/1.000 kcal, ou seja, 28 g diárias de fibras em uma dieta de 2.000 kcal. Para crianças com mais de dois anos, a ingestão mínima diária de fibras recomendada pela Fundação Americana de Saúde (*American Health Foundation*) é calculada somando cinco gramas mais o número de gramas correspondente à idade da criança em anos. Por exemplo, uma criança de oito anos deve consumir 13 g diários de fibras (5 g + 8 g (anos) = 13 g) (SLAVIN, 2008). A inulina e os FOS não possuem fração insolúvel e são rapidamente fermentadas no cólon. Por isto, possuem menor potencial de influenciar as funções intestinais que as fibras insolúveis encontradas nos farelos de cereais, como celulose e lignina. Já foi demonstrada, entretanto, sua capacidade de aumentar a frequência da evacuação (RANINEN et al., 2011).

Devido à não-digestibilidade, os FOS são adequados para diabéticos. Estudos indicam que eles não influem no nível glicêmico e não estimulam a secreção de insulina (NINESS, 1999; MADRIGAL; SANGRONIS, 2007). A frutose, entretanto, que é formada pela hidrólise dos frutooligossacarídeos, pode provocar efeitos metabólicos indesejáveis se consumida em grande quantidade. Estudos indicam que as taxas de obesidade e diabetes foram mantidas baixas quando o consumo total de frutose foi mantido na faixa de 25 a 40 g/dia (SÁNCHEZ-LOZADA et al., 2008). Em quantidades maiores, porém, a frutose pode induzir resistência à insulina, elevação do nível de triglicerídeos e da pressão arterial em humanos mais do que amido ou glicose utilizados nos tratamentos controles (SEGAL et al., 2007; BROWN et al., 2008; STANHOPE et al., 2008). Em experimentos com animais também foi observada obesidade abdominal, estresse oxidativo, disfunção endotelial, hiperuricemia e lesão renal (SÁNCHEZ-LOZADA et al., 2008).

#### *1.3.1.2 Efeito prebiótico*

Uma das características mais conhecidas dos FOS é o estímulo ao crescimento de bactérias benéficas no intestino, como bifidobactérias e, em menor escala, lactobacilos (JENKINS; KENDALL; VUKSAN, 1999; TUOHY et al., 2001; KOLIDA; GIBSON, 2007; ROBERFROID, 2007a). O cólon é um sistema complexo com mais de 400 tipos de bactérias. Algumas linhagens têm efeitos patogênicos, como a produção de toxinas e compostos carcinogênicos, enquanto outras são consideradas promotoras da saúde. Ao promover o crescimento seletivo das bifidobactérias, que são capazes de hidrolisar e utilizar os frutanos devido à produção da enzima  $\beta$ -frutofuranidase, os FOS fornecem a elas vantagem

competitiva frente a outras bactérias com efeitos deletérios presentes no cólon, contribuindo para a saúde do hospedeiro. Em geral são observados aumentos de 0,5-1,0 ciclo logarítmicos no número de bifidobactérias. Entre os efeitos benéficos das bifidobactérias encontram-se: inibição do crescimento de bactérias patogênicas, modulação do sistema imunológico, produção de enzimas digestivas, repressão da atividade de rotavírus, aumento da absorção de certos íons e síntese de vitaminas do complexo B (KOLIDA; GIBSON, 2007).

Diversos trabalhos demonstraram o efeito bifidogênico dos FOS em humanos. Mehne et al. (2000) realizaram um estudo com oito pacientes consumindo 8 g FOS/dia durante cinco semanas e observaram um aumento no número de bifidobactérias e a diminuição do pH fecal. Os trabalhos de Rao (2001) e Guigoz et al. (2002) também observaram aumento significativo no número de bifidobactérias nas fezes; Rao (2001) avaliou oito pacientes jovens ingerindo 5 g FOS/dia durante três semanas e Guigoz et al. (2002) realizou estudo com 19 pacientes idosos ingerindo 8 g FOS/dia durante três semanas. A contagem de bifidobactérias fecais nos idosos apresentou aumento de quase 3 log<sub>10</sub> UFC.

Langlands et al. (2004), por sua vez, demonstraram, juntamente com o efeito bifidogênico, o aumento da contagem de Lactobacilos na mucosa de 14 voluntários que ingeriram 7,5 g de FOS e 7,5 g de inulina por duas semanas antes de procedimento de colonoscopia, em que foram retiradas amostras da mucosa de diferentes partes do cólon e do reto. As análises indicaram um aumento médio na contagem de Bifidobactérias e Lactobacilos de 1,0 e 0,5 log<sub>10</sub> UFC/g de mucosa do cólon, respectivamente.

Os efeitos benéficos da oligofrutose também foram demonstrados em crianças, aumentando a contagem de bifidobactérias nas fezes e protegendo a microbiota benéfica durante tratamento com amoxicilina (VEEREMAN, 2007). Waligora-Dupriet et al. (2007) administraram 2 g/dia de FOS a crianças de sete a 19 meses durante 21 dias e observaram o aumento da contagem de bifidobactérias, o que não ocorreu nos pacientes que receberam maltodextrina como placebo. Simultaneamente, foi constatada a redução significativa da contagem de *Clostridium difficile* e de episódios de flatulência, diarreia, vômitos e febre.

Os estudos indicam que uma dose de 5-8 g/dia deve ser suficiente para estimular benéficamente a microbiota do cólon. Em doses maiores que 20 g/dia, porém, os FOS podem provocar efeitos colaterais, como desconforto devido à produção de gases (KOLIDA; GIBSON, 2007; ROBERFROID, 2007a).

### 1.3.1.3 Absorção de minerais

Além da quantidade de minerais ingeridos na dieta, a sua absorção também é um fator determinante, e os frutooligossacarídeos estão entre os compostos que vem sendo avaliados por aumentar a absorção de minerais (ROBERFROID, 2005). Scholz-Ahrens e Schrezenmeir (2007) demonstraram em experimentos com animais que FOS não-digeríveis aumentaram a absorção de minerais como cálcio, magnésio e fósforo, em alguns casos, e de elementos traços, como cobre, ferro e zinco. O aumento da absorção foi maior em animais com maior demanda por cálcio, especialmente em fase de crescimento acelerado.

Outros estudos, realizados com adolescente e mulheres no período pós-menopausa, demonstram que a ingestão regular de quantidades moderadas de FOS, com consumo adequado de minerais, pode aumentar significativamente a absorção de cálcio e magnésio (GRIFFIN; DAVILA; ABRAMS, 2002; HOLLOWAY et al., 2007; SOUZA et al., 2010). Ainda são necessárias mais pesquisas para comprovar a relação entre o cálcio absorvido e os benefícios à estrutura óssea, mas as evidências já suportam a hipótese de que os FOS estão envolvidos na mineralização e na densidade óssea (ROBERFROID, 2005; WEAVER, 2005).

## 1.3.2 Propriedades tecnológicas dos FOS

Os FOS são considerados fibras alimentares e classificados como ingredientes, e não aditivos alimentares, na maioria dos países, possuindo a classificação GRAS (*Generally Recognized as Safe*) nos Estados Unidos (PASSOS; PARK, 2003). Deste modo, podem ser utilizados como ingredientes em alimentos e bebidas sem limite especificado. Em geral, são aplicados pelo duplo benefício de fornecerem benefícios nutricionais e melhorarem a qualidade organoléptica (FRANCK, 2002).

Os FOS estão disponíveis em pó ou como um xarope viscoso incolor, com 75 % de sólidos. Possuem perfil adoçante semelhante ao da sacarose com aproximadamente 35 % de sua doçura. Por isto, podem substituir o açúcar parcial ou totalmente, quando em combinação com edulcorantes de alta intensidade, como aspartame e acesulfame K, fornecendo um perfil de sabor balanceado e mascarando o sabor residual (GONZALEZ-TOMÁS; COLL-MARQUÉS; COSTELL, 2008). Devido às propriedades semelhantes às da sacarose, os FOS também podem ser usados para melhorar o *mouthfeel* (sensação na boca) dos produtos em que são adicionados, mas sem formar cristais que podem provocar sensação de aspereza, como pode acontecer com a inulina (MEYER et al., 2011; TÁRREGA; TORRES; COSTELL,

2011). Também realçam o sabor de frutas e apresentam boa estabilidade durante os processos usuais da indústria de alimentos, como tratamento térmico, mas as ligações  $\beta(2\rightarrow1)$  entre as unidades de frutose podem ser parcialmente hidrolisadas em condições de alta temperatura e acidez, liberando moléculas de frutose (FRANCK, 2002; HAULY; MOSCATO, 2002).

As propriedades tecnológicas dos FOS os tornam ingredientes interessantes para aumentar a umectância e a vida de prateleira de produtos de panificação, diminuir o ponto de congelamento de sobremesas congeladas, aumentar a crocância em biscoitos de baixo teor de gordura, agir como aglutinante em barras de cereais e ainda diminuir a atividade de água, assegurando estabilidade microbiológica. Ou seja, sua função é semelhante à do açúcar, mas com os benefícios de baixas calorias e enriquecimento com fibras e prebióticos (FRANCK, 2002; HAULY; MOSCATO, 2002; NINESS, 1999).

Diferentemente das outras fibras, os FOS não possuem sabores indesejáveis e não alteram a viscosidade, permitindo o desenvolvimento de alimentos ricos em fibras semelhantes ao original. Além disso, a sua alta solubilidade (80 % em água a temperatura ambiente) permite a incorporação de fibras em bebidas e produtos lácteos. Nestes últimos, aumentam a ação das culturas probióticas adicionadas, exercendo efeito simbiótico (FRANCK, 2002; NINESS, 1999). A Tabela 3 resume as aplicações dos FOS em alimentos.

**Tabela 3** - Resumo das aplicações dos frutooligosacarídeos na indústria de alimentos

<i>Aplicação</i>	<i>Funcionalidade</i>	<i>Dosagem (% massa/massa)</i>
Produtos lácteos	Substituto de açúcar Sinergia com edulcorantes Corpo e <i>mouthfeel</i> Estabilidade de espuma Fibras e prebióticos	2-10
Sobremesas congeladas	Substituto de açúcar Sinergia com edulcorantes Textura e ponto de derretimento Fibras e prebióticos	5-12
Produtos de panificação	Retenção de umectância Substituto de açúcar Fibras e prebióticos	2-25
Cereais matinais	Crocância Fibras e prebióticos	2-15
Recheios	Substituto de açúcar Melhoria de textura	2-50
Preparados de frutas	Substituto de açúcar Sinergia com edulcorantes Corpo e <i>mouthfeel</i> Fibras e prebióticos	5-50
Produtos dietéticos e substitutos de refeições	Substituto de açúcar Sinergia com edulcorantes Corpo e <i>mouthfeel</i> Fibras e prebióticos Baixo valor calórico	2-20
Pastilhas	Substituto de açúcar Fibras e prebióticos	2-10

Fonte: Franck (2002)

A inulina e os FOS também podem ser utilizados na formação de nanopartículas de hidrogéis para a liberação de fármacos no cólon. Os hidrogéis podem ser definidos como redes poliméricas hidrofílicas que absorvem grande quantidade de água (até 20 % de sua massa seca), sem dissolver ou perder sua integridade estrutural. Eles vêm sendo estudados para várias aplicações médicas e farmacêuticas, como lentes de contato e materiais para implantes (VERVOORT et al., 1998; VERVOORT et al., 1999). Também podem ser usados na preparação de formas farmacêuticas que permitem a liberação do fármaco após expansão em contato com o meio de dissolução ou em resposta a estímulos fisiológicos como temperatura, pH, enzimas, biomoléculas (glicose, uréia, insulina), força iônica e oxidação (VILLANOVA; ORÉFICE; CUNHA, 2010). As nanopartículas de hidrogéis, por sua vez, ganharam atenção recentemente como um dos sistemas de liberação controlada de fármacos

mais promissores, devido à combinação de características dos sistemas de hidrogéis e das nanopartículas (HAMIDI; AZADI; RAFIEI, 2008).

### 1.3.3 Produção comercial da inulina e dos FOS

Vários prebióticos são produzidos em escala industrial e estão amplamente disponíveis comercialmente. Eles são, em geral, provenientes de matérias-primas de baixo custo, mas a maioria é obtida por meio de processos enzimáticos, cujas etapas de síntese e posterior purificação podem encarecer a produção (FIGUEROA-GONZÁLEZ et al., 2011).

Os FOS disponíveis comercialmente podem ser obtidos de duas maneiras: por hidrólise enzimática de inulina extraída das raízes de chicória ou por síntese enzimática a partir da sacarose. O processo de extração de inulina é semelhante ao da extração de açúcar da beterraba: as raízes de chicória são fatiadas e lavadas e a inulina é extraída das raízes por difusão em água quente, purificada e seca. O produto resultante contém moléculas com 2 a 60 unidades de frutose, possuindo GP médio entre 10-12 unidades e 6-10 % de açúcares simples, como glicose, frutose e sacarose. Com a ação de uma inulinase, a inulina é então hidrolisada para produzir os FOS, que contém entre 2 e 10 unidades de frutose, GP médio igual a 4 e 5 % de açúcares em base seca (glicose, frutose e sacarose), tendo 30 % do poder edulcorante da sacarose. Este tipo de FOS é comercializado como Raftilose<sup>®</sup>, produzido pela Orafiti Ltda, da Bélgica, ou como Frutafit<sup>®</sup>, produzido pela Imperial-Suikner Unie, da Holanda Nutricionais (NINESS, 1999; PASSOS; PARK, 2003).

O segundo tipo de FOS, produzido por síntese enzimática de transfrutoseilação em resíduos de sacarose utilizando a  $\beta$ -frutofuranosidase, possui entre 1 e 4 unidades de frutose e 5% de açúcares. É fabricado pela Meiji Seika Ltd (Tóquio, Japão), sendo comercializado como Neosugar<sup>®</sup>, Profeed<sup>®</sup>, Meioligo<sup>®</sup> ou Nutraflora<sup>®</sup>, e pela Béghin Meiji Industries, que o comercializa como Actilight<sup>®</sup>. Os dois tipos de FOS contém as ligações  $\beta(2\rightarrow1)$ , proporcionando os mesmos benefícios nutricionais (NINESS, 1999; PASSOS; PARK, 2003). Uma terceira alternativa para a produção de FOS poderia ser a extração a partir das raízes de yacon, que vem sendo muito estudado nos últimos anos devido ao alto teor de oligofrutose e às propriedades prebióticas.

#### 1.4 YACON (*Smallanthus sonchifolius*)

O yacon (*Smallanthus sonchifolius* (Poepp. et Endl.) H. Robinson, conhecido anteriormente como *Polymnia sonchifolia*), é uma planta originária dos Andes, da família *Asteraceae*, que possui raízes tuberosas comestíveis. A maior parte da raiz é formada por água, com matéria-seca entre 10 e 30 %, composta principalmente por carboidratos, como frutose, glicose, sacarose e oligossacarídeos de baixo grau de polimerização (3 a 10), além de traços de amido (OHYAMA et al., 1990). Os oligossacarídeos encontrados no yacon consistem em frutanas, formadas por várias moléculas de frutose unidas por ligações  $\beta(2\rightarrow1)$ , sendo classificados como frutooligossacarídeos (FOS) do tipo inulina (GOTO et al., 1995).

Apesar de semelhante às raízes de batata doce ou de dália em aparência, o seu interior é suculento e com sabor doce, semelhante à pêra (SEMINARIO; VALDERRAMA; MANRIQUE, 2003). Nos mercados locais andinos, o yacon é classificado como fruta, e vendido juntamente com maçãs, abacates e abacaxis. É muito consumido *in natura*, especialmente após um período de exposição ao sol, chamado *soleado* em espanhol, que aumenta o nível de açúcares livres e acentua o sabor doce, mas também é processado para a obtenção de sucos, xaropes, polpa ou *chips*, em que o produto é laminado e desidratado (GRAU; REA, 1997).

O yacon foi introduzido no Brasil no início dos anos 1990, em Capão Bonito, São Paulo, onde apresentou uma produtividade de 100 toneladas por hectare (GRAU; REA, 1997). Seu consumo, entretanto, somente aumentou significativamente nos anos 2000, quando a raiz tornou-se conhecida como batata yacon ou batata diet (SANTANA; CARDOSO, 2008).

No Rio Grande do Sul, o yacon já vem sendo cultivado em várias cidades. Desde 2003, a Emater/RS desenvolve um trabalho de multiplicação e produção de yacon na região de Erechim, observando a adaptação ao clima e a produção desta planta. Os resultados obtidos foram positivos, indicando a viabilidade da produção no Estado (YACON..., 2003). Segundo informações fornecidas em 2010 pelo Eng<sup>o</sup> Agrônomo Luiz Antonio Busatta, do escritório regional da Emater em Erechim, é uma planta de fácil plantio e desenvolvimento, que não requer muita tecnologia e cuidados para seu desenvolvimento, não necessitando tratamento para controle de pragas e doenças. Em um solo com adubação e drenagem de média a boa, apresenta boa produtividade e fácil colheita, em um misto entre a Mandioca e Batata Doce. Completa seu ciclo em nove ou dez meses, mas não resiste a geadas (informação oral). A Figura 2 ilustra raízes de yacon cultivadas pela EMATER.



**Figura 2** – Raízes de yacon cultivadas pela EMATER em Erechim, RS



Fonte: EMATER Erechim (2010)

#### **1.4.1 Composição química e teor de frutooligossacarídeos do yacon**

A matéria-seca da raiz de yacon contém alto teor de frutooligossacarídeos (8-46 %), com grau de polimerização entre 3 e 10 frutanos, e açúcares simples, como frutose, glicose e sacarose (LACHMAN et al., 2004; OJANSIVU; FERREIRA; SAMINEN, 2011). Na Tabela 4 é indicada a composição das raízes frescas de yacon baseada em uma compilação dos trabalhos disponíveis na literatura.

**Tabela 4** – Composição de raízes de yacon frescas indicada na literatura

<i>Componente</i>	
Água (g/100g)	70 - 93
Carboidratos (g/100g)	9 - 13,8
Proteínas (g/100g)	0,1 - 4,9
Lipídeos (g/100g)	0,1 - 0,464
Cinzas (g/100g)	0,3 - 6,0
Fibras (g/100g)	0,3 - 4,1
Valor calórico (kcal/100g)	14 - 22
Potássio (mg/100g)	180 - 334
Cálcio (mg/100g)	6 - 131
Fósforo (mg/100g)	21 - 309
Ferro (mg/100g)	0,2 - 0,3
Retinol (mg/100g)	10
Caroteno (mg/100g)	0,08 - 0,13
Tiamina (mg/100g)	0,01 - 0,07
Riboflavina (mg/100g)	0,1 - 0,31
Niacina (mg/100g)	0,33
Ácido ascórbico (mg/100g)	5 - 13

Fonte: Ojansivu, Ferreira e Salminen (2011)

Esta composição química e a relação entre a quantidade de FOS e de açúcares simples sofrem variações ao longo do desenvolvimento da planta e após a colheita, devido, principalmente, à ação de três enzimas. A síntese dos FOS em plantas está relacionada à ação da sacarose:sacarose frutossiltransferase (SST), que catalisa a transferência de uma unidade frutossil para a sacarose, formando 1-kestose, o menor oligofrutano, e da frutano:frutano frutossiltransferase (FFT), que catalisa a reação de dois oligofrutanos, formando outro de maior grau de polimerização. Após a colheita, durante o armazenamento do yacon, a quantidade de oligofrutanos e o seu grau de polimerização são influenciados pela ação da enzima frutano exo-hidrolase (FEH), que hidrolisa os frutanos liberando açúcares simples (FUKAI, 1993; NARAI-KANAYAMA; TOKITA; ASO, 2007; SANTANA; CARDOSO, 2008).

Graefe et al. (2004) observaram que, após seis dias de exposição do yacon ao sol, ocorreu uma diminuição dos oligofrutanos de 50-62 % para 29-44 %, enquanto que os açúcares livres (sacarose, glicose e frutose) aumentaram de 29-34 % para 45-51 %. Estes resultados indicam que a hidrólise parcial dos FOS inicia logo após a colheita, o que pode ser evitado armazenando o produto a baixas temperaturas e alta umidade relativa. Além disso, devido ao seu alto teor de água e à grande susceptibilidade a danos físicos, especialmente durante a colheita e o transporte, a raiz do yacon possui uma vida de prateleira curta, e a sua deterioração inicia-se em poucos dias. Oliveira e Nishimoto (2005), em trabalho para

determinar o período ideal de armazenamento da raiz de yacon visando à maior concentração de oligofrutanos, concluíram que a raiz pode ser armazenada por, no máximo, 21 dias sob armazenamento refrigerado. Após, inicia-se o escurecimento interno, além da diminuição da quantidade dos FOS. Sob temperatura ambiente, o tempo total de armazenamento não deve passar de sete dias.

As raízes de yacon também contêm uma quantidade elevada de polifenóis em comparação com outras raízes e tubérculos, em torno de 200 mg/100 g de matéria-prima fresca. Os polifenóis mais abundantes são o ácido clorogênico e pelo menos quatro derivados do ácido caféico. Outros compostos com atividade antioxidante relatados são a quercetina e os ácidos ferúlico e gálico. Embora a concentração de polifenóis nas raízes seja alta, sua concentração é muito maior em outros órgãos da planta, como as folhas (MANRIQUE; PÁRRAGA; HERMANN, 2005; OJANSIVU; FERREIRA; SALMINEN, 2011). O consumo prolongado de extrato das folhas do yacon, entretanto, não é recomendado, pois pode causar danos renais (OLIVEIRA et al., 2011).

#### **1.4.2 Escurecimento enzimático do yacon**

Durante o descascamento e o processamento do yacon, quando as membranas das células são rompidas, as enzimas citoplasmáticas, como a polifenoloxidase, entram em contato com os compostos fenólicos e catalisam a oxidação de fenóis a quinonas na presença de oxigênio livre, em um processo conhecido como oxidação enzimática. Estas quinonas, que são moléculas altamente reativas, combinam-se com grupos amino ou sulfidril de proteínas e açúcares redutores, formando polímeros de alta massa molecular e cores diferentes. Estes compostos são chamados de melanina, e são responsáveis pela cor escura de alguns alimentos (MANRIQUE; PÁRRAGA; HERMANN, 2005; SANTANA; CARDOSO, 2008).

No yacon, o escurecimento é ativado alguns segundos após o corte e o esmagamento das raízes. A superfície das raízes escurece rapidamente e a cor original do suco (semelhante ao do suco de melão) muda de forma irreversível a verde escuro, prejudicando a sua aparência (MANRIQUE; PÁRRAGA; HERMANN, 2005).

O controle do escurecimento enzimático é geralmente limitado à inibição das enzimas polifenoloxidase e peroxidase. Entre os métodos propostos para a prevenção da oxidação, estão: a desidratação, o armazenamento a baixas temperaturas, o tratamento térmico, a utilização de antioxidantes, a eliminação do oxigênio do meio, entre outros. Uma alternativa sugerida por Rivera e Manrique (2005) é a utilização de 1,3 g de ácido ascórbico para cada

quilograma de extrato de raízes descascadas passadas por centrífuga a fim de controlar o escurecimento do suco de yacon. O trabalho de Padilha et al. (2009), por sua vez, indica a utilização de solução de cloreto de cálcio 1 % por 30 minutos e de solução de metabissulfito de potássio 0,5 % por 5 minutos.

### **1.4.3 Processos de extração de inulina e frutooligossacarídeos**

Os métodos convencionalmente utilizados para extrair inulina de produtos vegetais, tais como alcachofra de Jerusalém ou raízes de chicória, incluem as seguintes etapas: lavagem dos tubérculos; fatiamento ou moagem; extração de inulina com água; tratamento do extrato com dióxido de carbono e cal; filtração e recuperação da inulina por precipitação ou evaporação (OLIVEIRA et al., 2004).

Um método para a extração de inulina a partir de alcachofras de Jerusalém e outros materiais contendo inulina foi descrito na patente de Hoehn, McKay e Murray (1983), com o objetivo de produzir xarope de frutose. O processo consiste na extração da inulina e outros frutanos com água quente (entre 80 e 90 °C), seguida da remoção de minerais e compostos nitrogenados de baixa massa molecular por ultrafiltração e da hidrólise enzimática da inulina a frutose e glicose.

Park et al. (2000) propõem um processo para obtenção de um concentrado de inulina utilizando a técnica de abaixamento de temperatura e posterior separação física. No processo, as raízes de chicória são lavadas, descascadas e picadas. Em seguida, as raízes sofrem o processo de extração e o extrato obtido é filtrado e concentrado. O extrato concentrado é levado a uma câmara de congelamento (temperaturas entre -8 e -50 °C), onde ocorre decantação dos frutooligossacarídeos pelo abaixamento de temperatura. Após descongelamento dos extratos, é feita a separação física entre as fases sobrenadante e precipitada, obtidas pelo abaixamento de temperatura do extrato.

Outro processo de obtenção de inulina e seus subprodutos a partir de tubérculos é descrito na patente de Park et al. (2003), englobando as seguintes etapas: pré-processamento, separação das folhas sãs, lavagem das folhas, secagem, tratamento das raízes, secagem dos materiais, moagem e peneiramento, extração da inulina das raízes secas, filtração da suspensão obtida, obtenção dos sólidos, ultrafiltração ou separação por membranas, concentração das suspensões e secagem ou cristalização do concentrado. Obtém-se inulina em pó com concentração de 40 a 98 % e 2 a 8 % de umidade final.

O estudo realizado por Cabello (2005) buscou desenvolver uma metodologia simples para extração dos carboidratos presentes no yacon e efetuar a remoção de resíduos e compostos originários de cores e odores indesejáveis. O processo de extração utiliza operações de separação sólido/líquido, utilizando papel filtro, em duas etapas: a primeira separa resíduos vegetais e a segunda remove moléculas grandes, como proteínas. De acordo com o autor, o pré-tratamento químico com adição de sulfato de alumínio causou hidrólise dos frutooligosacarídeos, detectado por um aumento na concentração de açúcares redutores totais, diretamente proporcionais à concentração de sulfato de alumínio utilizado no tratamento de coagulação. Estas alterações possibilitaram a agregação de particulados, permitindo a separação da fase líquida por filtração simples.

Toneli (2006), em um estudo para obtenção de uma solução concentrada de inulina de raízes de chicória, obteve o extrato de inulina por um processo de extração com água quente seguido de concentração sob pressão reduzida até o valor de 24 °Brix. A solução concentrada foi submetida ao abaixamento de temperatura seguida de centrifugação para separação de fases.

Considerando que a aplicação dos FOS em alimentos e bebidas exige alta pureza e que o grau de polimerização influencia no efeito prebiótico, técnicas de purificação com alta seletividade são importantes para obter os efeitos desejados. A tecnologia de membranas, especialmente a ultra e a nanofiltração, vem sendo estudada como uma forma promissora para a produção industrial de oligossacarídeos (PINELO; JONSSON; MEYER, 2009).

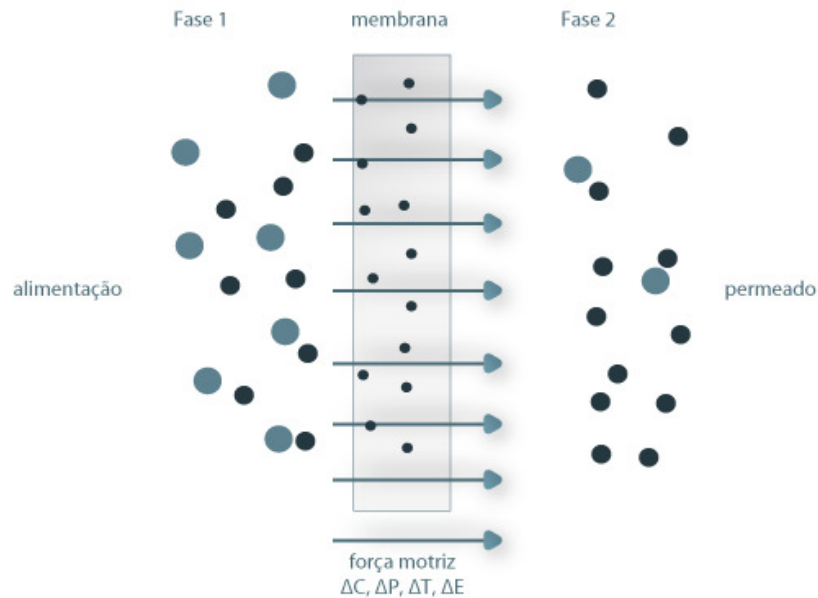
## 1.5 PROCESSOS DE SEPARAÇÃO POR MEMBRANAS (PSM)

Os processos de separação por membranas baseiam-se na permeabilidade seletiva de um ou mais componentes através da membrana. Deste modo, tanto a fase retida quanto a que permeia são enriquecidas em um ou mais componentes, permitindo a concentração, o fracionamento e a purificação de compostos. Estas características permitem várias aplicações na indústria de alimentos, desde a clarificação de bebidas e a concentração e purificação de compostos presentes em solução ao tratamento de efluentes (ROSENBERG, 1995).

O transporte através da membrana pode ocorrer por difusão ou convecção, induzido por um gradiente de pressão, concentração, temperatura ou potencial elétrico, conforme ilustrado na Figura 3. Os mecanismos que regulam este transporte de massa são complexos, e dependem basicamente de características da membrana, como tamanho médio e distribuição dos poros, composição e interação química com o fluido de alimentação e de parâmetros do

processo, como pressão, temperatura, velocidade de fluxo de alimentação (BARROS, 2002; VAN REIS; ZYDNEY, 2007).

**Figura 3** - Representação esquemática de um sistema de duas fases separado por uma membrana



Fonte: Universidade de Coimbra (2010)

O processo de ultrafiltração é semelhante à filtração tradicional. As moléculas de solventes e solutos de menor tamanho permeiam através dos poros da membrana devido à diferença de pressão aplicada, enquanto que outras moléculas ou partículas de maior tamanho são retidas. As membranas de ultrafiltração possuem tamanho de poros entre 1 e 20 nm e são geralmente empregadas para a separação de macromoléculas com massa molecular superior a 1 kDa. A maioria das membranas comerciais de ultrafiltração é constituída de materiais poliméricos, como, por exemplo, polissulfona, polietersulfona, poliacrilonitrila e derivados de celulose e polieteramida (RODRIGUES et al., 2003).

A nanofiltração é definida como um processo intermediário entre a ultrafiltração e a osmose inversa, que rejeita moléculas com tamanho na ordem de um nanômetro. Foi introduzida no final da década de 1980, aplicada inicialmente no tratamento de efluentes e na obtenção de água potável (VAN DER BRUGGEN; MÄNTÄRI; NYSTRÖM, 2008). As características de outros processos de separação por membranas estão descritas na Tabela 5.

**Tabela 5** – Resumos das características dos principais processos de separação por membranas

<i>Processo</i>	<i>Força motriz</i>	<i>Material retido</i>	<i>Aplicações</i>
Microfiltração (MF) Poros: 0,2 – 10 µm	Gradiente de pressão 0,1 – 1 bar	Massa molar (MM) > 200 kDa Bactérias, bolores, levedura, gordura, amido	- Clarificação de vinho e cerveja - “Esterilização bacteriana” - Concentração de células
Ultrafiltração (UF) Poros: 1 nm – 0,2 µm	Gradiente de pressão 0,5 – 5 bar	MM: 1-200 kDa Colóides, polissacarídeos, proteínas, vírus	- Fracionamento e concentração de proteínas - Recuperação de pigmentos - Recuperação de óleos
Nanofiltração (NF)	Gradiente de pressão 1,5 – 40 bar	MM: 300 - 1000 Da Pode eliminar alguns íons	- Purificação de proteínas - Desmineralização
Osiose Inversa (OI)	Gradiente de pressão 20 – 100 bar	MM: 100 Da (menor 1 nm) Quase todo material em suspensão	- Dessalinação e desmineralização da água - Concentração de sucos
Diálise (D)	Gradiente de concentração	Moléculas de MM > 5000 Da	- Hemodiálise - Rim artificial - Separação de sais
Eletrodiálise (ED)	Gradiente de potencial elétrico	Macromoléculas e compostos iônicos	- Concentração de soluções salinas

Fonte: Ordoñez et al. (2005); Universidade de Coimbra (2007)

Entre as vantagens da utilização das membranas estão a possibilidade de concentração sem mudança de fase, diminuindo o gasto energético da operação e dispensando a presença de caldeiras. Por ocorrerem à temperatura ambiente e sem a utilização de solventes orgânicos, estes processos causam poucas alterações organolépticas e nutricionais, produzindo alimentos de alta qualidade. Além disso, as operações de separação por membranas em geral são simples e de fácil escalonamento, e os sistemas são compactos e flexíveis, devido à possibilidade de substituição dos módulos das membranas, podendo ser adaptados a sistemas contínuos ou a outros processos de separação (DAUFIN et al., 2001; KAMADA et al., 2002a; SAXENA et al., 2009).

Os processos de separação por membranas, porém, possuem algumas desvantagens, como o alto investimento e a possibilidade de concentrar as soluções até o máximo de 30 % de sólidos totais, impedindo a secagem total dos produtos. Outro problema é a possível redução de fluxo do produto devido a dois problemas: polarização por concentração e *fouling* (RAMASWAMY; MARCOTTE, 2006). O primeiro fenômeno é reversível e ocorre devido ao acúmulo dos solutos parcial ou totalmente retidos pela membrana em sua superfície. Esse aumento da concentração de solutos na superfície da membrana em relação à solução que está sendo filtrada gera um gradiente de concentração que é compensado, em parte, por uma difusão destes solutos no sentido contrário ao do solvente que permeia a membrana. Além disso, as partículas acumuladas provocam uma resistência hidráulica adicional ao fluxo de permeado (VAN REIS; ZYDNEY, 2007). As principais conseqüências deste fenômeno são descritas a seguir (BALDASSO, 2008):

- a) na separação de solutos de baixa massa molar, como sais, pode ocorrer a diminuição na retenção observada devido ao aumento da concentração de soluto na superfície da membrana;
- b) na separação de misturas contendo solutos macromoleculares pode ocorrer o aumento da retenção: as partículas de maior massa molar, retidas completamente, acabam por formar uma camada extra na superfície da membrana, que acaba retendo um número maior de partículas menores, podendo influenciar decisivamente a seletividade do processo;
- c) diminuição do fluxo através da membrana: a difusão de solutos no sentido contrário ao do fluxo de permeado, devido ao gradiente de concentração na superfície da membrana, pode diminuir a força motriz exercida sobre o processo.

A polarização por concentração é considerável em membranas sujeitas a alto fluxo, como as de micro e ultrafiltração. Não pode ser evitada, mas sua extensão pode ser controlada ajustando as condições operacionais, como baixa pressão e alta turbulência junto à superfície da membrana, especialmente em processos de filtração tangencial (BALDASSO, 2008; VAN REIS; ZYDNEY, 2007).

Já o *fouling* ocorre quando os solutos se depositam e/ou são adsorvidos na superfície e nos poros da membrana, modificando a sua estrutura e as suas propriedades de separação. É muitas vezes irreversível e sua natureza e extensão são influenciadas consideravelmente pela composição química da membrana e pelas interações soluto-membrana (VAN REIS; ZYDNEY, 2007). Soluções para minimizar o *fouling* são o pré-tratamento, como a pré-



filtração da solução de alimentação para a remoção dos solutos de maior tamanho, e a limpeza das membranas (VAN DER BRUGGEN; MÄNTÄRI; NYSTRÖM, 2008).

### **1.5.1 Aplicação dos PSM na indústria de alimentos**

Entre as principais aplicações dos processos de separação por membranas na indústria de alimentos estão a concentração, a clarificação e a desacidificação de sucos de frutas e vegetais. Como estes processos são realizados a temperatura ambiente, eles preservam as características organolépticas e os nutrientes, permitindo a obtenção de sucos concentrados que, após a diluição, se assemelham a sucos frescos. Além disso, é possível obter polpas clarificadas estáveis com alto teor de sólidos totais, como, por exemplo, polpa de manga (DAUFIN et al., 2001; SAXENA et al., 2009).

Vários autores vêm avaliando a utilização dos PSM no processamento de sucos. Ongaratto e Viotto (2009) clarificaram suco de pitanga utilizando micro e ultrafiltração, buscando a concentração de carotenóides da fruta. Lopes et al. (2005) utilizaram ultrafiltração e osmose inversa para clarificar suco de acerola, e Cianci et al. (2005) utilizaram os mesmos processos na clarificação e concentração de suco de caju. A concentração do suco de laranja por osmose inversa foi avaliada por Silva et al. (1998).

No processamento de cerveja, a microfiltração tangencial pode ser utilizada para clarificar a bebida, eliminando leveduras e partículas provenientes do malte e do lúpulo e obtendo uma cerveja límpida. Esta é uma alternativa aos métodos tradicionais, como a filtração com terra diatomácea, mas ainda apresenta problemas como a baixa vazão. A microfiltração também pode ser utilizada para a pasteurização a frio da cerveja, obtendo estabilidade microbiológica e maior tempo de conservação com poucas alterações organolépticas, devido à ausência de processamento térmico (DAUFIN et al., 2001; SAXENA et al., 2009).

Os processos de separação por membranas também possuem aplicações na fabricação de vinhos. A microfiltração pode ser utilizada para obter limpidez e estabilidade microbiológica em uma etapa única, através da remoção de bactérias e leveduras, mantendo as características sensoriais. Além disso, a eletrodialise pode ser utilizada para remover íons de potássio, cálcio e ácido tartárico, evitando a formação de cristais de tártaro (DAUFIN et al., 2001).

Em produtos lácteos, os PSM estão muito desenvolvidos e possuem diversas aplicações, como a remoção de bactérias e esporos por microfiltração (pasteurização a frio),

que não afeta o sabor e proporciona uma vida de prateleira mais longa do que a pasteurização. Esta técnica é muito utilizada na produção de queijos que requerem leite não-pasteurizado. A ultrafiltração é utilizada para a recuperação de proteínas do soro do leite, através da separação da lactose e dos sais, e para a concentração do leite para fabricação de queijo (BRANS et al., 2004; BALDASSO, 2008; SAXENA et al., 2009).

### **1.5.2 Aplicação dos PSM na purificação de oligossacarídeos**

Por todas as vantagens dos processos de separação por membranas e pela vasta aplicação na indústria alimentícia, eles estão entre os métodos mais promissores para a concentração e a purificação de oligossacarídeos. Permitem separar produtos de diferentes massas molares e graus de polimerização, que podem influenciar nas propriedades funcionais e tecnológicas, devido à alta seletividade e à preservação da estrutura das moléculas (PINELO; JONSSON; MEYER, 2009). Deste modo, os frutooligossacarídeos do yacon podem ser recuperados a partir de processos de separação por membranas tangenciais que fazem uso de membranas cerâmicas ou orgânicas (GIBERTONI; NOGUEIRA; VENTURINI FILHO, 2006).

Gibertoni, Nogueira e Venturini Filho (2006) realizaram um trabalho com o objetivo de produzir um xarope rico em frutanos a partir de suco de yacon clarificado em membranas cerâmicas de micro e ultrafiltração com massa molar de corte de 14  $\mu\text{m}$  e 50 kDa, respectivamente. Realizaram ensaios combinando pressões transmembrana de 2 e 4 bar, com velocidades tangenciais de 2 e 4 m/s e temperatura de 40 °C. Verificaram que a combinação de pressão de 2 bar e velocidade de 4 m/s resultou em maior fluxo de permeado. As análises físico-químicas mostraram um acúmulo de sólidos totais e maiores valores de acidez total nas soluções retidas da ultra e da microfiltração, bem como uma tendência dos valores de sólidos solúveis, cinzas e proteína bruta dos permeados serem menores em relação aos retidos, garantindo a clarificação de suco de yacon. A composição de carboidratos não foi alterada pelos processos de separação por membranas aplicados. Para obtenção de xaropes ricos em frutanos, os permeados foram concentrados até 74,5-81,0 °Brix em evaporador rotativo a vácuo, e não foi observada a hidrólise de carboidratos.

Entretanto, a ultra e a microfiltração aplicadas no trabalho destes autores não foram eficazes na purificação dos frutooligossacarídeos de maior grau de polimerização. A provável explicação é o fato de a massa molar de corte utilizada na ultrafiltração (50 kDa) ser maior que o tamanho das FOS a serem purificados, permitindo que eles passassem através da

membrana juntamente com os mono e dissacarídeos, como glicose, frutose e sacarose e impossibilitando a separação (GIBERTONI; NOGUEIRA; VENTURINI FILHO, 2006).

Kamada et al. (2002a), por sua vez, avaliaram a eficácia da combinação de ultra e nanofiltração para purificar e concentrar frutooligossacarídeos da raiz de yacon. Para a obtenção do extrato de sacarídeos, as raízes de yacon foram liofilizadas, moídas, dissolvidas em água e aquecidas a 98 °C por 2 horas. Este extrato foi pré-filtrado e submetido a uma ultrafiltração em batelada utilizando membranas de polissulfona com massa molar de corte de 20 kDa, de modo a reter moléculas grandes, como proteínas, amido, fibras e outros materiais em suspensão, permitindo a passagem dos açúcares e FOS. As condições ideais de operação foram 6 L/min para taxa de escoamento e pressão transmembrana de 5,2 bar. A solução de sacarídeos clarificada foi então submetida à nanofiltração, utilizando membranas de compósitos de poliamida com rejeição nominal de sais de 65, 30, 10 e 3 %, com o objetivo de reter os oligossacarídeos e permitir a passagem dos açúcares livres e dos sais. As condições ideais de operação foram 6,2 L/min para taxa de escoamento e pressão transmembrana de 50 bar. Os autores obtiveram um produto final concentrado em 25 vezes, com a remoção da maior parte dos mono e dissacarídeos e a concentração de moléculas com GP de três ou mais. Ao final da nanofiltração, foram obtidos FOS com 98 % de pureza. Utilizando metodologia semelhante, mas tendo como matéria-prima oligossacarídeos em pó provenientes das raízes de chicória dissolvidos em água, Kamada et al. (2002b) obtiveram um produto final concentrado em 20 vezes, reduzindo o teor de mono e dissacarídeos de 9,0 para 2,6 % ao final do processo. Concluíram que a combinação de ultra e nanofiltração é promissora para a produção de FOS concentrados de alto valor agregado. Os trabalhos de Kamada et al. (2002a) e Kamada et al. (2002b), porém, diferentemente do presente estudo, não avaliaram o efeito da diafiltração na purificação dos frutooligossacarídeos.

## 1.6 CARACTERÍSTICAS DOS FRUTOOLIGOSSACARÍDEOS EM PÓ

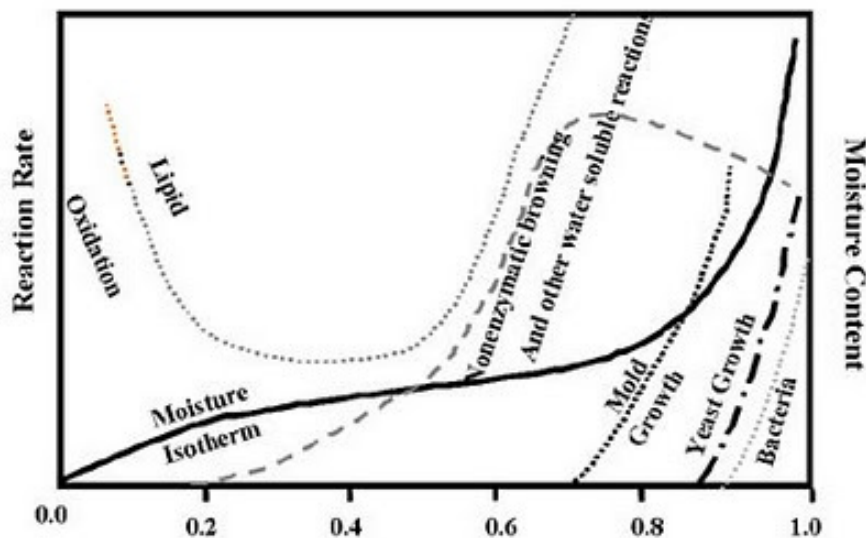
Os frutooligossacarídeos estão comercialmente disponíveis como um xarope viscoso incolor, com 75 % de matéria-seca, ou como um pó seco através de atomização (FRANCK, 2002). A comercialização na forma de pó possui como vantagens a facilidade de manipulação, transporte, armazenamento e consumo (FIGUEIRA et al., 2004). Durante a armazenagem, entretanto, os alimentos em pó são expostos a condições variadas de temperatura e umidade relativa e perdem ou ganham água para equilibrar a sua umidade com a do ambiente. Quando a umidade da inulina e dos FOS em pó varia, podem ocorrer algumas alterações físicas, tais

como a aglomeração ou o endurecimento (TONELI et al., 2008). Com a finalidade de determinar e compreender as alterações nas propriedades físico-químicas relacionadas à absorção de água e, com isso, prever a estabilidade dos alimentos em que estes ingredientes são adicionados, costuma-se avaliar parâmetros como a atividade de água, a microestrutura e a cristalinidade (RONKART et al., 2006).

### 1.6.1 Atividade de água

Atividade de água ( $a_w$ ) é definida como a razão entre a pressão de vapor da água presente em um alimento e a pressão de vapor da água pura, na mesma temperatura (AHMED; RAMASWAMY; KHAN, 2005). Está relacionada com as reações químicas de escurecimento não enzimático, oxidação, atividade enzimática, crescimento microbiano, entre outras, conforme ilustrado na Figura 4. É possível perceber que o teor de água livre é um dos principais fatores na estabilidade de um alimento, pois as maiores taxas de reação ocorrem em alimentos com umidade alta e intermediária. Na faixa de atividade de água de 0,2 a 0,4, minimizam-se as taxas das reações de deterioração. A atividade de água máxima tolerada nos produtos desidratados, sem induzir a perda de propriedades desejáveis, oscila entre 0,35 e 0,5, dependendo do produto (FENNEMA, 2010).

**Figura 4** - Velocidade relativa de reações em função da atividade de água.



Fonte: Adaptado de Labuza (1968)

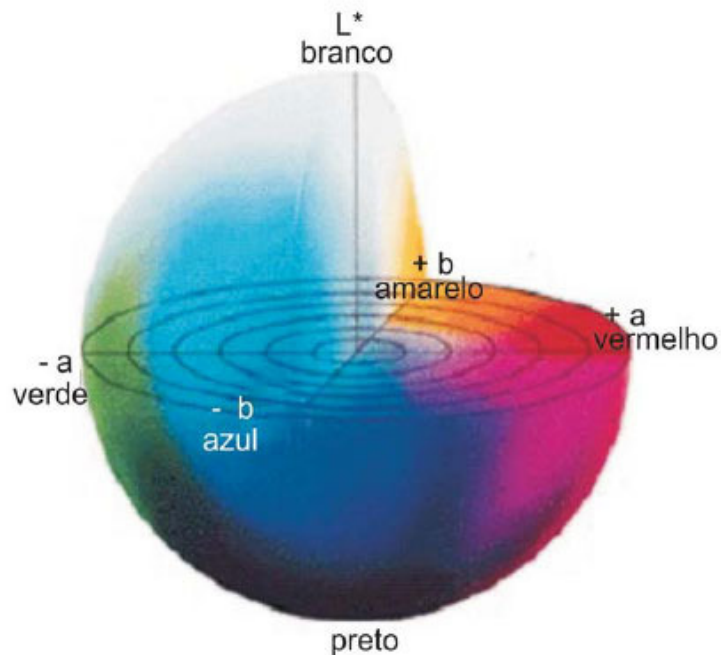
### 1.6.2 Cor

A cor faz parte da aparência de um produto e é um dos principais atributos de qualidade, pois é a primeira impressão de um dado alimento pelo consumidor. Se a cor for inaceitável, outros aspectos sensoriais talvez nem sejam avaliados. A cor do produto pode afetar a percepção de outros atributos, como aroma, gosto e sabor, influenciando a aceitabilidade, escolha e preferência. Além disso, é utilizada como um indicador dos processos que ocorrem em um produto (MALHEIROS, 2007).

Uma das técnicas usadas para observar as mudanças de cor nos alimentos é a medição por meio de aparelhos específicos que iluminam a amostra e medem a energia luminosa refletida ou transmitida pela superfície. Os aparelhos mais utilizados pela sua sensibilidade são os espectrofotômetros e os colorímetros tristímulo que, além de descrever a deterioração visual da cor, fornecem informações para o controle de qualidade dos produtos (FANTE, 2011). Os valores obtidos pelo equipamento são convertidos em relações matemáticas para descrever a cor, chamados sistemas de cor. O sistema atualmente recomendado pela Commission Internationale de l'Eclairage – CIE – ou Comissão Internacional de Iluminação é o CIE  $L^*a^*b^*$ , que mais proximamente representa a sensibilidade humana para cor (MALHEIROS, 2007).

O sistema tridimensional de cores CIE  $L^*a^*b^*$  fornece três coordenadas retangulares ( $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$ ) que permitem ao observador determinar com exatidão a cor da amostra. Neste sistema, o eixo z corresponde à luminosidade expressa pela variável ( $L^*$ ) e assume valor zero para o preto absoluto e 100 para o branco total; o eixo x corresponde às cores que variam do verde ( $-a^* = -60$ ) ao vermelho ( $+a^* = +60$ ); e o eixo y corresponde às cores que variam do azul ( $-b^* = -60$ ) ao amarelo ( $+b^* = +60$ ) (HUNTERLAB, 2001). A Figura 5 apresenta as coordenadas do sistema CIE  $L^*a^*b^*$ .

**Figura 5** – Coordenadas do sistema CIEL\*a\*b\*



Fonte: Adaptado de Minolta, 1994.

### 1.6.3 Microestrutura

A microestrutura de alimentos é definida como a organização dos componentes de um alimento e suas interações, e pode ser alterada durante o processamento. O conhecimento de como um alimento está estruturalmente organizado vem sendo reconhecido como pré-requisito para a compreensão de suas propriedades, permitindo descrever, prever e controlar o seu comportamento, já que estrutura e funcionalidade estão fortemente relacionadas. Deste modo, técnicas de análise de microestrutura são necessárias para entender as relações estrutura-propriedade (NOGUEIRA, 2002).

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) é uma das técnicas usadas para examinar superfícies de amostras secas (MEV convencional) ou congeladas abaixo de  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  (cryo-MEV). O exame das superfícies internas das amostras pode ser realizado se elas forem previamente fraturadas e expostas. Uma ampla faixa de aumentos pode ser usada (20x-100.000x), possibilitando alcançar uma profundidade de campo aproximadamente 500 vezes maior que a microscopia ótica. Este tipo de microscópio é constituído de lentes, circuito de varredura, coletor e amplificador de sinais, tubo de raios catódicos, sistema de vácuo e registro de imagens (FANTE, 2011).

Na microscopia eletrônica de varredura a área ou o microvolume a ser analisado é irradiado por um fino feixe de elétrons, no lugar da radiação da luz utilizada na microscopia ótica. A interação do feixe de elétrons com a superfície da amostra emite uma série de radiações que, quando captadas corretamente, fornecem informações características sobre a amostra, como topografia da superfície, composição, cristalografia, etc. (MALISKA, 2004). Deste modo, é possível identificar a existência de rugosidades, fendas e poros na superfície dos pós (MURRIETA-PAZOS, 2012). Segundo Toneli et al. (2008), não há estudos relacionando a qualidade da inulina em pó ao tamanho ou ao formato das partículas, mas são desejáveis partículas com poucas imperfeições superficiais, o que garantirá uma maior escoabilidade do produto. Com esta técnica também é possível observar o fenômeno de aglomeração de polissacarídeos, visualizando a formação de pontes sólidas entre as partículas adjacentes (RONKART et al., 2006). Vários autores a utilizaram na caracterização da microestrutura da inulina (NOGUEIRA, 2002; RONKART et al., 2006; TONELI et al., 2008; RONKART et al., 2009).

A microscopia eletrônica de varredura pode ser associada à espectroscopia por energia-dispersiva de raios-X (EDS ou EDX) permitindo a análise da composição atômica da amostra com uma profundidade de até alguns micrômetros (MURRIETA-PAZOS et al., 2011). Através da captação pelos detectores e da análise dos raios-X característicos emitidos pela amostra, resultado da interação dos elétrons primários com a superfície, é possível obter informações qualitativas e quantitativas da composição da amostra na região de incidência do feixe de elétrons. Atualmente quase todos os MEV são equipados com detectores de raios-X, principalmente o por energia dispersiva, devido à facilidade de operação e à confiabilidade (MALISKA, 2004). Esta técnica apresenta a vantagem de permitir a observação da amostra pelo MEV antes da realização da análise de EDS, mas ainda é pouco utilizada na análise de alimentos e ingredientes em pó (MURRIETA-PAZOS et al., 2012).

#### **1.6.4 Cristalinidade**

Está estabelecido para vários produtos conhecidos, como sacarose, amido ou produtos lácteos, que o estado da matéria (amorfo ou cristalino) afeta significativamente a estabilidade ou a aplicação na indústria alimentícia e farmacêutica (RONKART et al., 2007). A cristalinidade de um produto tem impacto na escoabilidade durante o armazenamento e nas propriedades de absorção de água (RONKART et al., 2006). A maioria dos produtos com teor reduzido de umidade é parcial ou completamente amorfa. Embora materiais amorfos tenham

maior solubilidade, porosidade e biodisponibilidade, eles possuem algumas propriedades indesejáveis, tais como instabilidade química, menor fluidez e maior aglomeração e *caking* em comparação com materiais cristalinos. A lactose amorfa, por exemplo, é termodinamicamente instável e higroscópica, adsorvendo umidade do ambiente, o que resulta em plastificação e na diminuição da temperatura de transição vítrea (YAZDANPANA; LANGRISH, 2011). Por adsorção de água, a lactose amorfa torna-se pegajosa e forma pontes com outras partículas que levam à aglomeração, formando um produto de baixa escoabilidade e difícil manuseio (BHANDARI; HOWES, 1999).

A difração de raios-X vem sendo usada para compreender o comportamento de cristalização da fração amorfa de polissacarídeos, relacionando-o ao estado físico, e foi empregada por autores como Zimeri e Kokini (2002), Ronkart et al. (2006), Kawai et al. (2011) e Panchev et al. (2011) na caracterização do estado de amostras de inulina de diferentes graus de polimerização.



## 1.7 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho teve como objetivo a concentração e a purificação dos frutooligossacarídeos presentes na raiz de yacon (*Smallanthus sonchifolius*) por meio da combinação de ultrafiltração e nanofiltração e a caracterização do pó enriquecido em frutooligossacarídeos obtido.

## 1.8 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Determinar as características físico-químicas do extrato de yacon resultante da mistura do suco obtido pela trituração das raízes de yacon com o líquido lixiviado das raízes trituradas;
- b) Empregar duas membranas de ultrafiltração com diferentes massas molares de corte para clarificar o extrato de yacon e de uma membrana de nanofiltração para concentrar os frutooligossacarídeos (FOS) recolhidos no permeado da ultrafiltração;
- c) Avaliar o efeito da pressão transmembrana no processo de ultrafiltração a fim de maximizar o fluxo e minimizar a formação de polarização por concentração e *fouling*;
- d) Empregar a diafiltração durante o processo de nanofiltração a fim de aumentar a pureza dos FOS por meio da maior remoção da glicose e da frutose;
- e) Determinar as características físico-químicas de separação das membranas de ultra e nanofiltração das diferentes correntes dos processos de separação por membranas: solução de alimentação, permeado e retido.
- f) Desidratar por liofilização o retido da nanofiltração enriquecido em frutooligossacarídeos, obtido pelo processo combinado de ultra e nanofiltração;
- g) Caracterizar a amostra liofilizada, através de medição da atividade de água e dos parâmetros de cor e da avaliação de sua microestrutura por microscopia eletrônica de varredura acoplada a espectroscopia por energia-dispersiva de raios-X (MEV-EDS) e de difração de raios-X.

## **CAPÍTULO 2**

### **Concentration and purification of yacon (*Smallanthus sonchifolius*) roots fructooligosaccharides using membrane technology**

Artigo a ser submetido para publicação na revista Separation and Purification Technology e formatado de acordo com as normas desta revista

## **Concentration and purification of yacon (*Smallanthus sonchifolius*) roots fructooligosaccharides using membrane technology**

Institute of Food Science and Technology, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

Laboratory of Membrane Separation Processes, Chemical Engineering Department, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

### **Abstract**

Yacon is a perennial plant originated from the Andean region which roots have been receiving increased attention due to their high content in prebiotic fructooligosaccharides (FOS). Apart from many health benefits, FOS present interesting characteristics as food ingredient, being used as sugar substitute, and its extraction from yacon roots may be an alternative to actually commercially available FOS. This work evaluated membrane technology for concentrating and purifying FOS from yacon roots extract, combining a first ultrafiltration (UF) clarifying step with nanofiltration (NF), with and without association with discontinuous diafiltration (DF). After UF, 63.75 % of the saccharides from the initial feed were recovered in total permeate. DF did not largely influenced FOS retention in NF (it increased from 68.78 % without DF to 70.48 % with DF), but decreased glucose and fructose retentions, from 40.63 to 31.61 % and 25.64 to 18.69 %, respectively, what was desirable, allowing a greater purification of FOS at the retentate. Saccharides yields in the NF final retentate through the combined UF-NF process were calculated as 50.89 % for total saccharides and as 51.85 % for FOS, with 19.75 % purity. The results indicate that the combined UF-NF is promising for concentrating yacon saccharides, but more diafiltration steps are required for improving FOS purity.

**Keywords:** Yacon; Fructooligosaccharides; Purification; Ultrafiltration; Nanofiltration

## 1. Introduction

Fructooligosaccharides (FOS) are storage carbohydrates found in several vegetables that can be considered prebiotics because they reach the colon intact and are selectively fermented by probiotic bacteria like *Lactobacillus* spp. and *Bifidobacterium* spp. [1-3]. They are linear polydisperse oligomers consisting mainly of  $\beta$ -(2 $\rightarrow$ 1) fructosyl-fructose linkages, sometimes containing a starting  $\alpha$ -D-glucose moiety, that resist hydrolysis by human small intestinal digestive enzymes, which are specific for  $\alpha$ -glycosidic bonds. They have thus been classified as ‘‘nondigestible’’ oligosaccharides [4] and are best characterized by their degree of polymerization, between 3 and 10 [1].

FOS, also known as oligofructose, are considered food ingredients, not additives, and used in many food applications as sugar substitutes [5]. Besides contributing to a well-balanced diet by increasing the fiber content and the diversity of the fiber sources, FOS specific fermentative characteristics are responsible for numerous health benefits. There are studies relating their consumption to a more balanced composition of intestinal microbiota [6-10], improved mineral absorption, especially in postmenopausal women [11] and female teenagers [12-14], and endocrine activities [15]. There are also evidence supporting improvement of systemic functions, as immune functions [16, 17] and lipid homeostasis [18, 19], as well as by reducing the risk of miscellaneous diseases [4].

Oligofructose is industrially produced by partial enzymatic hydrolysis (using an endo-inulinase) of inulin extracted from chicory roots or by synthesis from sucrose using fructosyl-transferase [5]. Studies related to new FOS' sources and production processes could be useful for allowing their application in a wider range of foods. An interesting possibility is their extraction from yacon (*Smallanthus sonchifolius*) roots, a perennial plant originated from the Andean region, whence it has spread to New Zealand, Japan and Brazil, which differ from other roots by storing carbohydrates in the form of FOS, instead of starch [20].

Yacon roots consist mostly of water, which usually exceeds 80 % of fresh weight, and carbohydrates, being rich FOS, especially 1-kestose (GF<sub>2</sub>), nystose (GF<sub>3</sub>) and 1- $\beta$ -D-fructofuranosylnystose (GF<sub>4</sub>). There are also 15-40 % of simple sugars, as sucrose, fructose and glucose. Other nutrients are reported to be low except for potassium [20, 21]. It has been reported, however, that the FOS content in yacon tuberous roots significantly decreases during postharvest storage, even at low temperature (5 to 10 °C) [22, 23]. Considering that yacon rootstocks are highly perishable, the development of alternative techniques for extracting, concentrating and purifying yacon FOS would allow its increased consumption by

addition to more frequently consumed products, as yoghurts, cereals and drinks. It would be also possible to reach levels at which a prebiotic effect may occur (5–8 g/d) [1].

A high selective separation technology is prerequisite for purity, especially when processing complex plant materials. Membrane technology, currently encompassing mainly ultrafiltration (UF) and nanofiltration (NF), is a potential feasible strategy for industrial manufacture of purified oligosaccharides [24, 25]. Membrane processes have a number of advantages compared to e.g. chromatographic purification techniques, which includes low energy requirements, hence sustainable processing, easy modification of the critical operational variables such as pressure, temperature, feed flow rate and agitation, and relatively easy scale-up [26].

Many authors have obtained good results using membrane technology for purifying oligosaccharides [27-30]. Kamada et al. [31] evaluated the effectiveness of combined UF-NF for purifying and concentrating oligosaccharides from yacon rootstock, obtaining a 25-fold concentrated retentate with 98 % of FOS purity. At a similar work, but with chicory rootstock, the NF retentate, in which mono and disaccharide content were reduced from 9.0 % of the initial solution to 2.6 %, was obtained as a 20-fold concentrated product, indicating that the combined membrane-processing system is quite promising for FOS purification [32]. Kamada et al. [31;32], however, did not evaluate the association of diafiltration for FOS purification. Kuhn et al. [33] used nanofiltration for purifying FOS present in a mixture of sugars, containing also glucose, fructose and sucrose, through NF membranes. Performing diafiltration, they obtained a retentate containing around 80 % of FOS.

In this study, ultra and nanofiltration were combined for purifying the yacon root extract, aiming to remove suspended solids and simple sugars as glucose and fructose and concentrate the yacon fructooligosaccharides. The association of NF with discontinuous diafiltration (DF) was also evaluated.

## **2. Material and methods**

### *2.1. Yacon roots extract*

The yacon (*Smallanthus sonchifolius*) roots were cultivated in São Paulo State, Brazil, and acquired from the Supply Centre of the Rio Grande do Sul State in the city of Porto Alegre, Brazil. The roots were cleaned and selected considering the absence of visible injury

and infection, and stored under refrigeration ( $8 \pm 2$  °C) until used, for no more than three weeks.

The yacon extract used in the UF-NF processes was prepared in two steps, adapting the methodology described by Toneli et al. [34]. Firstly, yacon roots were sliced and kept for 20 minutes in a 0.5 % sodium metabisulfite solution for minimizing enzymatic browning [35]. The roots were ground in a food multiprocessor and the extracted juice was kept refrigerated. After this, residual saccharides were extracted from ground roots by lixiviation, through the addition of 80 °C water in a proportion of 2 kg of water to 1 kg of ground roots. This mixture was kept at an average temperature of  $80 \pm 2$  °C for 1 h and then filtered through a 270 mesh sieve for removing the yacon triturated roots. The two obtained yacon fractions - the juice and the liquid extracted from ground roots – were then filtered and mixed, resulting the so called yacon extract. In order to minimize fouling during ultrafiltration, two different filters were used, with 1  $\mu\text{m}$  and 22  $\mu\text{m}$  nominal pore sizes.

## 2.2. Membranes

Three different membranes (two UF and one NF membranes) were tested in a flat sheet module for selecting the most adequate for FOS purification. Their main characteristics are described in Table 1.

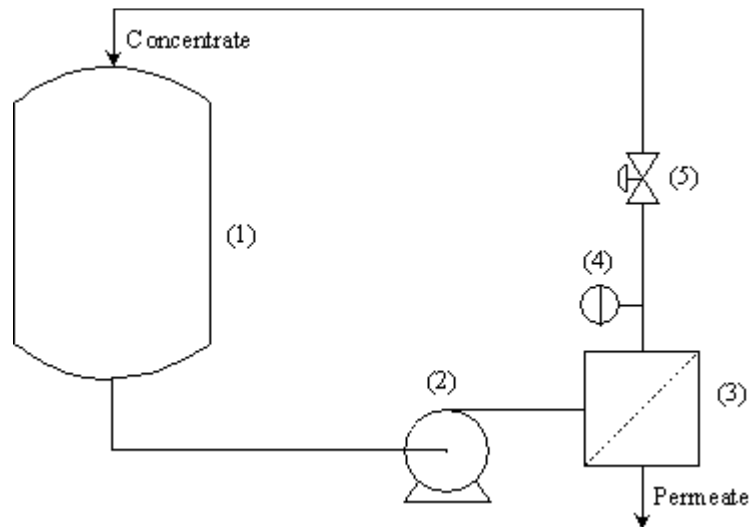
**Table 1** - Characteristics of the membranes used in UF and NF experiments

Membrane	NMWCO (Da)	Material	Area (m <sup>2</sup> )	Manufacturer
UF-10	10,000	Polyethersulfone	0.00572	Synder
UF-30	30,000	Polyethersulfone	0.00572	Synder
NF-1000	1,000	Regenerated cellulose	0.00572	Millipore

\*NMWCO – nominal molecular weight cut-off

## 2.3. UF/NF equipment

Experiments were performed in a pilot plant, WGM-KOCH PROTOSEP IV, shown schematically in Figure 1.



**Figure 1** - Schematic representation of the membrane bench scale unit. Legend: (1) tank, (2) pump, (3) flat-sheet membrane module, (4) manometer and (5) valve for pressure control.

The pilot plant comprises the following equipments: (1) feed tank made of glass with a volume of 1,0 L; (2) pneumatic pump, diaphragm type, model Versamatic VM50, operated with compressed air through a system comprising a FLR kit (filter, air regulator and lubricator); (3) a housing for the flat-sheet module, in 316 stainless steel, allowing the installation of membranes with an area of 0.00572 m<sup>2</sup>; (4) manometer of 316 stainless steel, with a scale from 0 to 10.5 bar; and (5) valve for pressure control.

#### 2.4. Experimental

Membranes tested for the separation of saccharides were compressed and characterized by their permeate fluxes of water and yacon extract for at least four transmembrane pressures ( $\Delta P$ ). The volumetric flux of permeate ( $J_p$ ) was calculated according to Equation (1) and expressed in L.m<sup>-2</sup>.h<sup>-1</sup>:

$$J_p = \frac{V_p}{A \cdot t} \quad (1)$$

where  $V_p$  is the permeate volume (L),  $A$  the membrane effective area (m<sup>2</sup>) and  $t$  the time necessary (h) for collecting  $V_p$ . The  $\Delta P$  of operation was determined by the permeate-flux ( $J_p$ )-vs- $\Delta P$  curve.

After defining the operating conditions, the yacon extract was processed in two stages, combining UF and NF cross-flow processes, according to the methodology described by Kamada et al. [31]. Pre-filtered yacon extract was subjected to batch UF processing,

recirculating the retentate to the feed tank in order to remove large molecules such as proteins and fibers and suspended substances, yielding a saccharide-rich permeate. The concentration-mode experiments were performed at a transmembrane pressure of 0.75 bar and 25 °C, controlled by water-cooling the feed tank; these operating conditions were determined in previous experiments. UF process was conducted until the initial feed volume was reduced by half.

In the second stage, the saccharides-containing clarified permeate obtained from the UF process was processed by NF, also in a concentration-mode with full recycling of retentate, in order to concentrate the oligosaccharides in the retentate and reduce glucose, fructose, sucrose and salts concentration. This operation was also done in association with a discontinuous diafiltration (DF) mode, which consisted of adding incremental volumes of distilled water to retentate aiming to optimize the salts, mono and disaccharides withdraw in the permeate while removing this added volume, increasing the degree of FOS purification. Every time permeate volume reached 50 mL, the same volume of water was added to retentate, totalizing 200 mL of added water. The NF experiments were performed at a transmembrane pressure of 4.5 bar, also determined in previous experiments.

### *2.5. Membrane fouling, cleaning protocol effectiveness and membrane retention*

In all UF-NF experiments, measurements of water flux were carried out before and after filtration to quantify the fouling formation on the membrane. A chemical cleaning procedure was performed at the end of each experiment to restore the flux and retention characteristics of the membrane and prevent the growth of microorganisms in the system. It consisted of rinses with distilled water, alkaline, acid and chlorine cleaning, respecting membranes pH and temperature limits.

Fouling was expressed in terms of the percentage difference in water permeate fluxes of the membranes before and after yacon extract ultrafiltration, according to Equation 2 [36]:

$$Fouling (\%) = \left( \frac{J_{pi} - J_{pf}}{J_{pi}} \right) \times 100 \quad (2)$$

where  $J_{pi}$  is water permeate flux of the virgin, unfouled membrane after compaction and before yacon extract UF and  $J_{pf}$  is water permeate flux after yacon extract UF and rinse with water to remove loosely bound foulants, at the same temperature and pressure conditions. It was considered the medium fouling value at the different  $\Delta P$  evaluated.



The effectiveness of the ultrafiltration cleaning protocol was measured by calculating the water flux recovery accordingly to Equation 3 [37]:

$$\text{Flux recovery (\%)} = \left( \frac{J_{pc}}{J_{pi}} \right) \times 100 \quad (3)$$

where  $J_{pc}$  is the water permeate flux after the application of the cleaning procedure at the same pressure and temperature than  $J_{pi}$ . It was again considered the different evaluated  $\Delta P$  medium value.

For each saccharide, the observed retention ( $R_{obs}$ ) was calculated from the Equation 4, based on permeate and retentate saccharides concentration at the end of the process, determined from the sample analysis:

$$R_{obs} (\%) = \left[ 1 - \frac{C_p}{C_r} \right] \times 100 \quad (4)$$

where  $C_p$  is the permeate concentration and  $C_r$  is the retentate concentration of a given saccharide.

## 2.6. Analytical methods

The moisture content of fresh yacon rootstock was measured weighting up and drying samples at 105°C until constant weight, according to AOAC (1984) method n. 984.25 [38]. The characteristics of yacon extract and of UF-NF feed, retentate and permeate samples were determined by measuring soluble solids content (in °Brix), electrical conductivity, pH and concentration of FOS, glucose and fructose by high performance liquid chromatography (HPLC). Soluble solids content were determined using a refractometer at 25 °C, according to AOAC. (2000) method n. 932.12 [39]. pH analyses were with a Digimed DM20 pH meter, following AOAC. (2000) method n. 981.12 [39]. Electrical conductivity was determined with a Tecnonon mCA150 conductivity meter.

HPLC analyses were performed adapting the method described by Zuleta and Sambucetti [40] and Scher et al. [41], using a Perkin Elmer series 200 chromatograph equipped with a refractive index detector (HPLC-RI) (PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Shelton, CT, USA) and Milli-Q water as the mobile phase at 0.6 mL.min<sup>-1</sup>, temperature of 80 °C and a Phenomenex Rezex RHM monosaccharide column, 330·7.8 mm, with a total run time of 14 min. The retention times were 6.766 min for oligofructose, 9.946 min for glucose and 10.742 min for fructose. All injections were carried out at least in duplicate. Saccharides content were used for mass balance determination throughout UF-NF process.

### 2.7. Saccharides purity and yield

The degree of purification of each saccharide  $i$  at UF and NF feed, permeate and retentate was calculated according to Equation 5 [25]:

$$Purity (\%) = \frac{C_s^i}{C_s^{Total}} \times 100 \quad (5)$$

where  $C_s^i$  is the concentration of saccharide  $i$  in a given stream (feed, permeate or retentate) and  $C_s^{Total}$  is total saccharides concentration in the same stream. The yield of each saccharide was calculated using Equation 6 [25]:

$$Yield (g \cdot kg_{yacon}^{-1}) = \frac{m_s^i}{m_{yacon}} \quad (6)$$

where  $m_s^i$  is the saccharide  $i$  mass (in g) in a given stream (feed, permeate or retentate) and  $m_{yacon}$  is yacon roots mass (in kg) used for preparing the yacon extract volume used in each UF-NF experiment.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Yacon extract characteristics

The yacon extract characteristics, resulting from the mixture of yacon juice and the liquid extracted from the ground roots by hot water diffusion, are described in Table 2. Yacon juice's and yacon extract's pH were close to values found by Scher et al. [41], who observed pH of  $6.09 \pm 0.01$  when evaluating fresh yacon roots from the same origin of the ones used in this experiment. Ribeiro [42] have also showed a similar value of 5.87.

**Table 2** - Yacon juice, liquid extract from ground roots and yacon extract characteristics: pH, soluble solids (°Brix) and saccharides content (g per 100 g dry matter (d.m.))

Parameter	Yacon juice	Liquid from ground roots	Yacon extract
pH	$6.09 \pm 0.07$	$5.64 \pm 0.03$	$6.03 \pm 0.07$
Soluble solids (°Brix)	$8.50 \pm 0.00$	$3.42 \pm 0.29$	$7.50 \pm 0.00$
FOS content (g per 100 g d.m.)	$8.12 \pm 0.06$	$1.72 \pm 0.01$	$10.55 \pm 0.02$
Glucose content (g per 100 g d.m.)	$14.89 \pm 0.13$	$2.66 \pm 0.06$	$17.30 \pm 0.03$
Fructose content (g per 100 g d.m.)	$18.52 \pm 0.03$	$2.91 \pm 0.02$	$20.60 \pm 0.01$
Yacon roots moisture (%)	$88.16 \pm 0.20$		

With respect to the soluble solids content, the yacon juice presented a value close to results reported by Manrique et al. [43], of 8 to 12 °Brix for yacon roots, and a little lower than values found by Scher et al. [41], of  $9.9 \pm 0.01$  °Brix, and by Hermann et al. [44], which varied from 9.9 to 12.6 °Brix, also for yacon roots. Soluble solids of yacon extract, of 7.5 °Brix, were lower due to water dilution with the liquid extracted from yacon ground roots.

The saccharides content of yacon extract, in a dry matter basis, were  $10.55 \pm 0.02$  g per 100 g of dry matter (d.m.) for FOS,  $17.30 \pm 0.03$  g per 100 g d.m. for glucose and  $20.60 \pm 0.01$  g per 100 g d.m. for fructose. The hot water lixiviated from yacon ground roots saccharides added 1.72, 2.66 and 2.91 g per 100 g d.m. of FOS, glucose and fructose, respectively, to yacon juice, what represented an increase of 21.23 %, 17.89 % and 15.70 % in respective saccharides content.

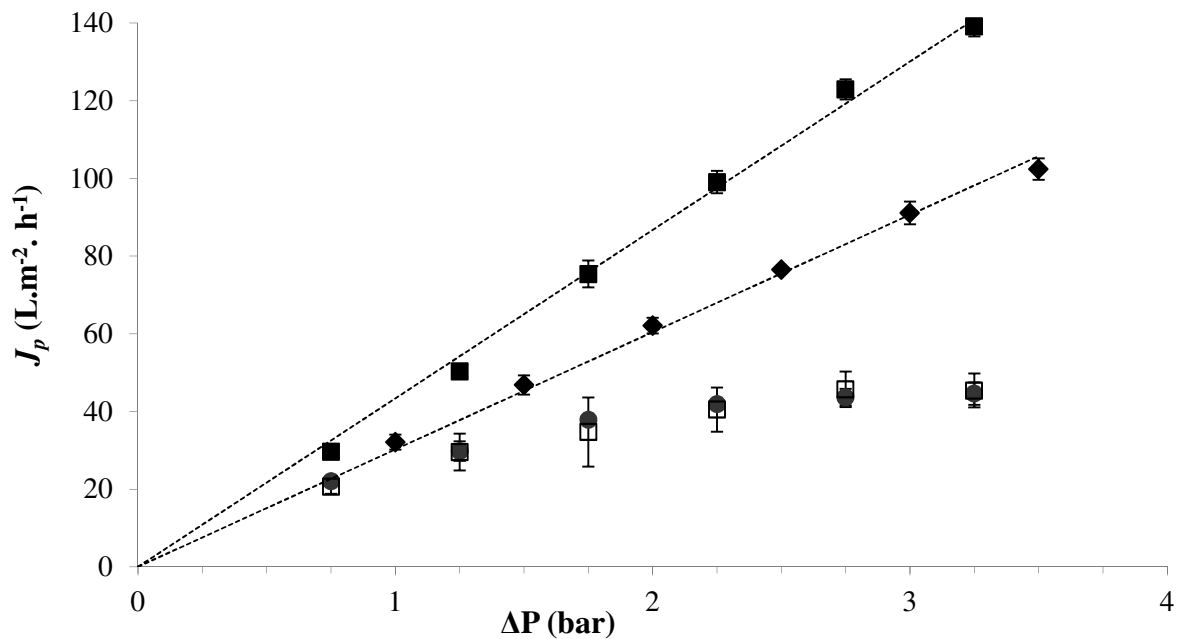
Scher et al. [41], evaluating yacon *in natura* without blanching, found values of, in g per 100 g d.m.,  $6.94 \pm 0.04$  for FOS,  $26.93 \pm 0.03$  for glucose and  $50.68 \pm 0.1$  for fructose. Lago et al. [45] obtained values of  $1.07 \pm 0.18$ ,  $3.30 \pm 0.28$  and  $2.99 \pm 0.18$  g per 100 g d.m. for FOS, glucose and fructose at yacon juice, respectively, and of  $3.15 \pm 0.16$ ,  $10.98 \pm 0.32$  and  $4.30 \pm 0.57$  g per 100 g d.m. for FOS, glucose and fructose, respectively, at the pulp (ground roots after juice extraction). Lachman et al. [23] evaluated saccharides content of four yacon ecotypes cultivated in four different years. Considerable differences among ecotypes and cultivation year were observed for oligofructose (8.0–46.0 g/100 g d.m.), glucose (2.04–17.9 g/100 g d.m.) and fructose levels (9.02–43.2 g/100 g d.m.). Bagautdinova et al. apud Lachman et al. [23]<sup>1</sup> observed a tendency of a decrease of FOS DP related to the cultivation of yacon in regions situated more to the North (at 56° of north latitude no inulin content was found). Tjukavin apud Lachman et al. [23]<sup>1</sup> found that the content of monosaccharides in yacon tubers cultivated in a plastic greenhouse was 37 % higher as compared to ones cultivated in the field. These differences summarize the difficult in comparing yacon saccharides among experiments, since there are many factors influencing their content, as year and method of cultivation and postharvest storage [46]. Enzymes related to synthesis and hydrolysis of oligofructose may also be involved, as already described by many authors [22, 47, 48]. Increasing amounts of mono- and disaccharides during storage are also common for the inulin and FOS containing roots of chicory (*Cichorium intybus* L.) and Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) [46].

---

<sup>1</sup> Original paper in Russian

### 3.2. Ultrafiltration

The water-permeate and yacon extract-permeate fluxes as functions of transmembrane pressure for the UF-10 and UF-30 membranes are shown in Figure 2. For both membranes, the flux of water increased linearly with transmembrane pressure, with  $R^2$  equal to 0.998, and the yacon extract-permeate flux was significantly smaller than the water-permeate flux for same operating conditions. It indicates that the concentration-polarization effect is significant for yacon extract and this effect tends to increase at higher transmembrane pressures (TMP). Concentration polarization occurs when TMP is large enough to form a gel layer on the membrane surface, limiting the permeation rate by back diffusion of the solute from the membrane surface to the bulk of the feed [49]. The accumulation of retained solutes at the upstream surface of the membrane leads to the reduction of effective pressure driven force due to the increase of filtration resistance and also osmotic pressure effects [50].

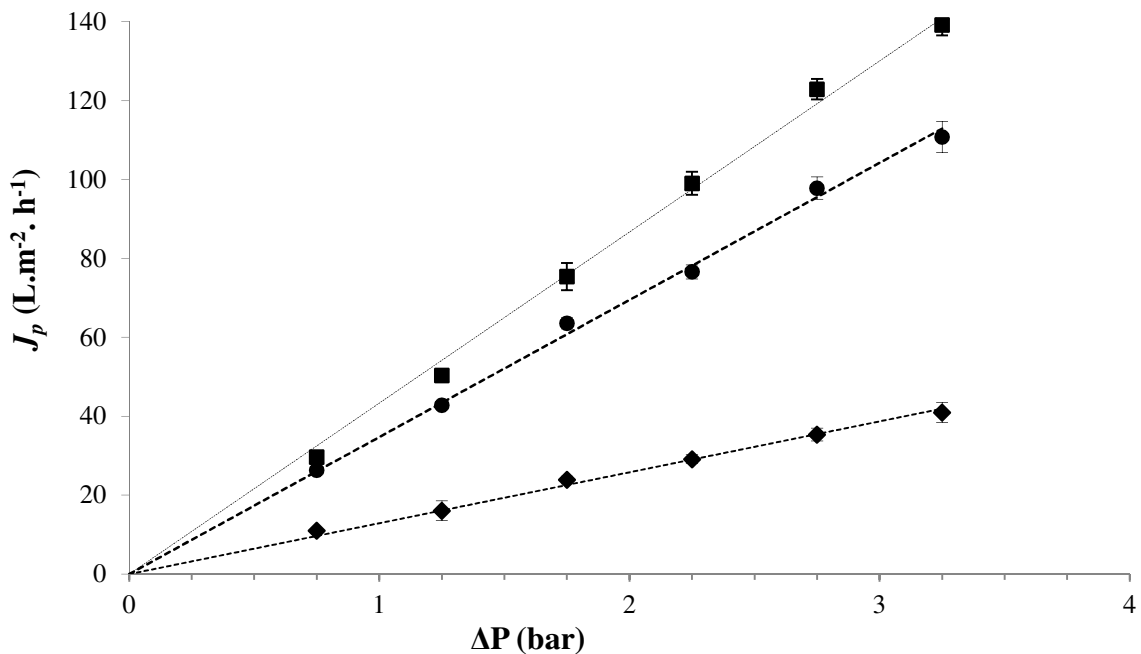


**Figure 2** – Water and yacon extract fluxes versus transmembrane pressure.  $T=25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $n=2$ . Legend - UF-10 membrane: (■) water, (●) yacon extract,  $1\text{ }\mu\text{m}$  pre-filter; UF-30 membrane: (◆) water, (□) yacon extract,  $1\text{ }\mu\text{m}$  pre-filter

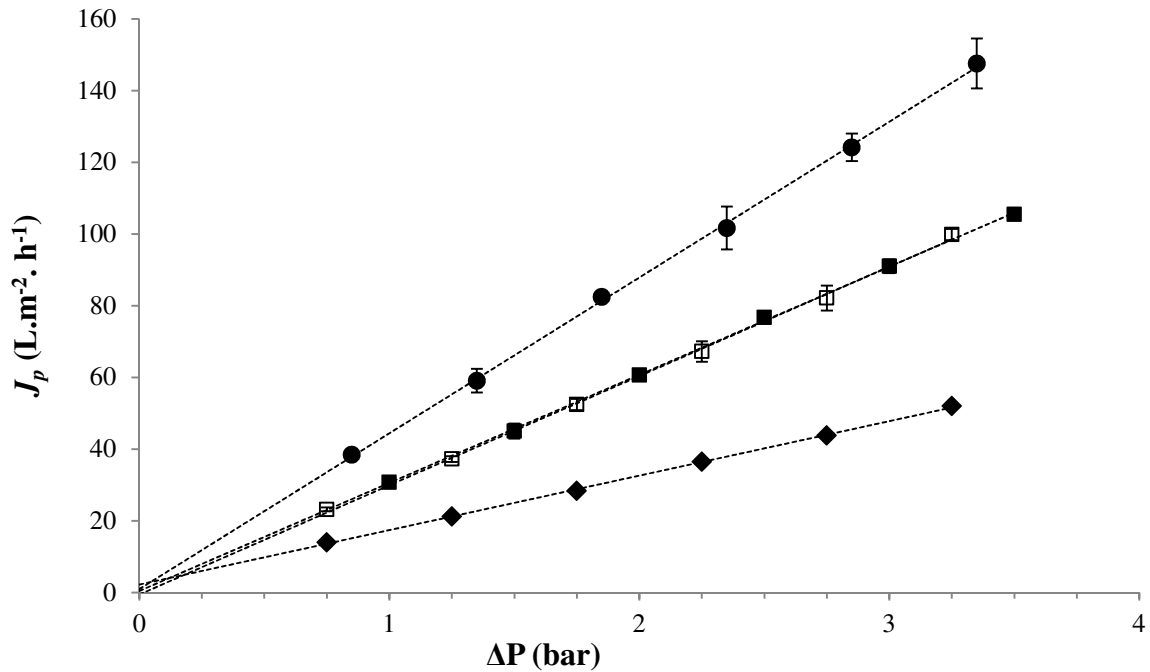
The concentration polarization cannot be completely avoided, but its extent can be controlled by adjusting the fluid flow characteristics, typically by providing low pressures and high shear rates at the membranes surface, in tangential flow filtration mode [50, 51]. It was noticed that, under pressures higher than 1.5 bar, yacon extract permeate flux became pressure-independent, indicating that limiting flux was reached. The limiting flux is the

maximum flux that can be achieved at steady state in an operation. Yacon extract-permeate flux curve was also used for estimating the critical flux – the maximum possible flux for minimizing fouling and concentration polarization tendency – that was determined by tracing a line from origin and identifying the point where it became non-linear. Using this method, the chosen transmembrane operating pressure for the ultrafiltration process was 0.75 bar, the higher TMP possible for operating the process under the critical flux and still providing acceptable permeate fluxes.

For UF-30 membrane, it took approximately 200 minutes until initial feed volume was reduced by half; for UF-10 membrane, this volume reduction was obtained in 310 minutes. Only a slight permeate-flux decline was observed for both membranes during process: for UF-10 membrane, it decreased from 15.3 to 13.8 L.m<sup>-2</sup>.h<sup>-1</sup> and for UF-30, from 27.6 to 24.3 L.m<sup>-2</sup>.h<sup>-1</sup>. Kamada et al. [31] observed larger yacon extract permeate-flux decrease, from 42 to 12 L.m<sup>-2</sup>.h<sup>-1</sup>, during UF with a 20 kDa MWCO membrane. This may be explained by the higher concentration factor: while the initial volume was reduced by half in this experiment, Kamada et al. [31] reduced the final retentate weight ratio to 3.3 % of the initial feed. Figure 3 and Figure 4 show water-permeate fluxes before ( $J_{pi}$ ) and after ultrafiltration ( $J_{pf}$ ) of yacon extract pre-treated with the 22  $\mu$ m filter for UF-10 and UF-30 membranes.



**Figure 3** – Water permeate fluxes ( $J_p$ ) versus transmembrane pressure before and after yacon extract ultrafiltration and after cleaning procedure. Membrane UF-10, 22  $\mu$ m pre-filter, T=25 °C, n=2. Legend: (■) Water permeate flux of virgin, unfouled membrane after compaction ( $J_{pi}$ ); (◆) Water permeate flux after yacon extract ultrafiltration ( $J_{pf}$ ); (●) Water permeate flux after cleaning procedure ( $J_{pc}$ ).



**Figure 4** - Water permeate fluxes ( $J_p$ ) versus transmembrane pressure before and after yacon extract ultrafiltration and after cleaning procedure. Membrane UF-30, 22  $\mu\text{m}$  pre-filter,  $T=25$  °C,  $n=2$ . Legend: (■) Water permeate flux of virgin, unfouled membrane after compaction ( $J_{pi}$ ); (◆) Water permeate flux after yacon extract ultrafiltration ( $J_{pf}$ ); (●) Water permeate flux after cleaning procedure ( $J_{pc}$ ); (□) Water permeate flux after membrane cleaning and re-compaction ( $J_{pr}$ ).

These water-fluxes were used for estimating membrane fouling, a common problem to all types of membrane separation that arises from a deposit formation on the external surface of the membrane and/or from adsorption on and within the membrane pores, promoting blocking or reduction in effective pores diameter [50]. Fouling tendency can be reduced by working below critical values of flux and pressure, balancing the hydrodynamic force driving solute towards the pores and the electrostatic forces opposing this motion [52]. Figure 3 and Figure 4 also show water-permeate flux after cleaning ( $J_{pc}$ ), used for evaluating the cleaning protocol effectiveness.

The optimum pre-filter distributes the particles/molecules evenly between the two filters (pre-filter and membrane) so both filters reach their maximum particle load and the process results more efficient. In table 3 is shown fouling formation and cleaning protocol effectiveness for UF-10 and UF-30 membranes and a comparison of results from ultrafiltration of yacon extract pre-treated with 1  $\mu\text{m}$  and 22  $\mu\text{m}$  filters. It can be observed that fouling was significantly lower when 1  $\mu\text{m}$  pre-filter was used, comparing to the 22  $\mu\text{m}$  pre-filter. It indicates that the 1  $\mu\text{m}$  pre-filter was more efficient in removing suspended particles that caused rapid plugging of membrane pores from yacon extract, promoting a feed pre-

clarification. A similar result was obtained by Saha et al. [36], comparing the flux profiles of sugarcane juice and a polysaccharide solution. Both fluxes declined exponentially, but the multicomponent sugarcane juice feed containing different sizes of macromolecules led to high fouling (60%), while with polysaccharides alone, no visible fouling was observed during the experiment.

**Table 3** – Membrane fouling (%) and water flux recovery (%) for UF-10 and UF-30 membranes with different pre-treatment filters (shown results are medium of two experiments)

	UF-10		UF-30	
	22 $\mu\text{m}$	1 $\mu\text{m}$	22 $\mu\text{m}$	1 $\mu\text{m}$
Fouling (%)	68.67	26.95	52.66	16.16
Flux recovery (%)	82.42	81.72	133.45*	139.81*

\*In both UF-30 experiments,  $J_{pc}$  was higher than initial  $J_{pi}$ , i.e. initial flux was totally recovered

The cleaning protocol effectiveness was not the same for both membranes. Water flux recovery after cleaning was partial for UF-10 membrane (81-82 %), but total for UF-30 membrane, which presented increased water permeate flux after cleaning comparing to water permeate flux of the virgin membrane after compaction. It may have been caused by UF-30 membrane decompaction, because water permeate flux returned to original values after a new compaction process ( $J_{pr}$ ). Fu et al. [53] noticed that two NF membranes with different properties required different cleaning processes even with the same feed. Song et al. [54] examined membrane cleaning and reported that the cleaning agents tested could not achieve complete flux recovery because some residual foulants were strongly embedded in the concavities of membrane surface. However, Al-Amoudi et al. [52] from the results of the permeability of a fouled NF membrane before and after cleaning showed that the cleaning process restored the declined flux close to its original value. Al-Amoudi and Lovitt [55] and Liikanen et al. [37] have noticed that cleaning, especially alkaline, often increases the flux of the virgin membrane.

Concentration of fructooligosaccharides, glucose and fructose at the feed, permeate and retentate on ultrafiltration of yacon extract pre-treated using 1  $\mu\text{m}$  filter are shown in Table 4, as well as each saccharide observed retention. Small differences in initial composition of saccharides were observed between samples due to different dilution with residual water present on system. UF aimed the clarification of the yacon extract with removal of large molecules, like proteins and other suspended solids, but low saccharides retentions, allowing them to pass through the membrane pores and be collected at the permeate.

According to Lachman et al. [21], yacon rootstocks are comprised, in general, of 83.1 % moisture, 13.8 % saccharides, 1.1 % ash, 1.0 % protein, 0.9 % fiber and 0.1 % lipids. Both membranes permeates were limpid and colorless, indicating that suspended solids of high molecular weight were probably removed. The FOS observed retention for the UF-30 membrane (14.77 %) was smaller than for the UF-10 membrane (22.35 %), as expected due to its higher MWCO. The same was observed for glucose and fructose.

**Table 4** - Concentration of fructooligosaccharides, glucose and fructose at the feed, permeate and retentate and saccharides observed retention in the yacon extract ultrafiltration using the UF-10 and UF-30 membranes

Sample	FOS (g.L <sup>-1</sup> )		Glucose (g.L <sup>-1</sup> )		Fructose (g.L <sup>-1</sup> )	
UF-10 Feed	9.04	± 0.03	18.38	± 0.03	23.54	± 0.01
UF-10 Permeate	7.98	± 0.07	18.59	± 0.02	23.85	± 0.01
UF-10 Retentate	10.28	± 0.01	19.64	± 0.00	25.40	± 0.02
UF-10 R <sub>obs</sub> (%)	22.35		5.36		6.10	
UF-30 Feed	8.57	± 0.59	15.73	± 0.44	20.30	± 0.05
UF-30 Permeate	7.42	± 0.80	15.51	± 0.34	20.21	± 0.35
UF-30 Retentate	8.71	± 0.87	15.57	± 0.63	20.55	± 0.28
UF-30 R <sub>obs</sub> (%)	14.77		0.42		1.65	

Ultrafiltration of yacon extract pre-treated using 22 µm filter showed significantly higher observed retentions for FOS, glucose and fructose compared to the 1 µm-filter pre-treated feed, as can be seen in Table 5, especially for UF-30 membrane. The increase in observed retentions may have been caused by a deficient suspended solids removal by the 22 µm filter, leading to increased concentration polarization layer and fouling. As can be seen in Table 3, the fouling extent was higher with the 22 µm pre-filter, for both membranes. The increase in retention was more significant to the UF-30 membrane, probably because of the rapid plugging of the larger-size pores of this membrane, leading to high fouling [36]. These results led to the use of 1 µm pre-filtered yacon extract in further experiments.

**Table 5** – Saccharides retention for UF-10 and UF-30 membranes with different yacon extract pre-treatment filters

	UF-10		UF-30	
	22 µm	1 µm	22 µm	1 µm
FOS retention (%)	27.00	22.35	47.80	14.77
Glucose retention (%)	13.95	5.36	18.90	0.42
Fructose retention (%)	17.70	6.10	25.14	1.65



Table 6 indicates pH, electrical conductivity and soluble solids measures at ultrafiltration feed, permeate and retentate. A slight decrease was observed for pH throughout the process with both membranes UF-10 and UF-30; higher pH differences, however, were necessary for suggesting microorganism multiplication. The measurement of electrical conductivity and soluble solids showed a slight increase in the retentate, indicating the higher solids content comparing to feed. Kamada et al. [31], during yacon extract ultrafiltration (20 kDa MWCO membrane), observed an increase in soluble solids from 2.0 °Brix in the initial feed to 10.9°Brix in the final retentate. A possible reason for this steep increase in soluble solids is the higher concentration factor used by these authors, who reduced the final retentate weight ratio to 3.3 % of the initial feed.

**Table 6** - pH, electrical conductivity and soluble solids at the feed, permeate and retentate of the UF-10 and UF-30 experiments, using 1 µm pre-filtered yacon extract\*

Sample	pH	Electrical conductivity (mS.cm <sup>-1</sup> at 25°C)	Soluble solids (°Brix)
UF-10 Feed	6.11 ± 0.01 <sup>a</sup>	2.93 ± 0.12 <sup>a</sup>	5.53 ± 0.06 <sup>a</sup>
UF-10 Permeate	5.95 ± 0.02 <sup>b</sup>	2.75 ± 0.04 <sup>b</sup>	5.00 ± 0.00 <sup>b</sup>
UF-10 Retentate	5.91 ± 0.03 <sup>b</sup>	3.27 ± 0.02 <sup>c</sup>	5.75 ± 0.00 <sup>c</sup>
UF-30 Feed	6.25 ± 0.03 <sup>A</sup>	2.37 ± 0.08 <sup>A</sup>	5.03 ± 0.04 <sup>A</sup>
UF-30 Permeate	6.35 ± 0.05 <sup>B</sup>	2.17 ± 0.05 <sup>B</sup>	4.50 ± 0.00 <sup>B</sup>
UF-30 Retentate	6.17 ± 0.02 <sup>C</sup>	2.46 ± 0.06 <sup>C</sup>	5.08 ± 0.12 <sup>C</sup>

\*For each group of membranes (UF-10 and UF-30), values on the same column with different letters are significantly different ( $P < 0.05$ )

Considering that high permeate-fluxes are desirable for improved process efficiency and low FOS retentions at this first step of the process will yield higher final content of purified FOS, for the nanofiltration experiments only UF-30 permeate was used.

### 3.3. Nanofiltration

No irreversible fouling occurred during the experiments since there were no differences in the water flux measurements before and after each filtration run and after cleaning. The same result was found by Goulas et al. [24] during the nanofiltration of a commercial galacto-oligosaccharide mixture.

Table 7 shows fructooligosaccharides, glucose and fructose concentration at nanofiltration feed, permeate and retentate, with and without diafiltration, and their respective observed retentions. Nanofiltration aimed the removal of salts and mono and disaccharides, like glucose, fructose and sucrose, concentrating yacon FOS at the retentate. It can be noticed

that diafiltration did not largely influenced FOS retention (it increased from 68.78 % without diafiltration to 70.48 % with diafiltration), but decreased glucose and fructose retentions, from 40.63 to 31.61 % and 25.64 to 18.69 %, respectively. The lower retention of monosaccharides with diafiltration was highly desirable, allowing a greater purification of FOS at the retentate.

**Table 7** - Concentration of fructooligosaccharides, glucose and fructose at the feed, permeate and retentate and saccharides observed retention in the nanofiltration step using the NF-1 membrane with and without diafiltration

Sample	FOS (g.L <sup>-1</sup> )			Glucose (g.L <sup>-1</sup> )			Fructose (g.L <sup>-1</sup> )		
<u>Without diafiltration</u>									
Feed	2.10	±	0.03	5.82	±	0.023	6.98	±	0.02
Permeate	0.68	±	0.00	3.52	±	0.009	5.22	±	0.01
Retentate	2.19	±	0.02	5.92	±	0.028	6.70	±	0.03
R <sub>obs</sub> (%)	68.78			40.63			25.34		
<u>With diafiltration</u>									
Feed	4.84	±	0.10	10.37	±	0.09	13.07	±	0.09
Permeate	1.58	±	0.06	6.93	±	0.13	9.99	±	0.12
Retentate	5.36	±	0.01	10.13	±	0.00	12.29	±	0.02
R <sub>obs</sub> (%)	70.48			31.61			18.69		

The retention differences observed for simple sugars and FOS were not as high as desired, especially at NF without diafiltration, what may be partially explained by the small (DP) from yacon oligosaccharides. According to a study undertaken by Pedreschi et al. [56], assaying the selective consumption of yacon saccharides by *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus* spp. probiotic strains, yacon FOS are composed of 27 % of GF<sub>2</sub>-type fructans, 54 % of GF<sub>3</sub> and 19 % of GF<sub>n≥4</sub> molecules. I.e., 81 % of yacon FOS are short oligomers with only two or three fructosyl units polymerized.

Kuhn et al. [33], during NF of a mixture of sugars containing FOS, glucose, fructose and sucrose with a 1000 Da MWCO membrane, under 18 bar pressure, room temperature and without diafiltration, obtained similar saccharides retentions: 64 %, 28 % and 31 % for FOS, glucose and fructose, respectively. The same authors, with a 300 Da MWCO membrane, obtained retentions of 66 %, 18 % and 15 % for FOS, glucose and fructose. Kamada et al. [31], during nanofiltration of a saccharides mixture from yacon roots previously clarified by UF (20 kDa MWCO membrane), calculated retentions of 14.0% for monosaccharides, 46.2% for disaccharides, 80.9% for trisaccharides and 91.5 to 99.9% for saccharides of DP 4 and higher, with a 1000 Da MWCO membrane at 50 bar. Using a 500 Da MWCO membrane, respective retentions were 64.9%, 81.6%, 97.3% and 99.2 to 99.9%. Goulas et al. [24]

observed retentions of 71 %, 45 % and 11 % for raffinose, sucrose and fructose, respectively, during nanofiltration with a 1000 Da MWCO membrane at 6.9 bar.

It is known that the fractionation of saccharides and oligosaccharides by nanofiltration depends on several factors: membrane pore size distribution, filtration pressure and temperature, solutes concentration and pH [28, 29]. Goulas et al. [24] reported increasing retentions of saccharides, especially monosaccharides, as pressure was increased from 6.9 to 27.6 bar, due to increased solvent flux and membrane compaction. The same authors also observed that an increase in temperature from 25 to 60 °C decreased retentions due to reduced viscosity and increased diffusion. The size of a monosaccharide is equal or smaller than the cut-off sizes of the NF membranes. The calculated diameters of the monosaccharide molecules are approx. 0.6–0.8 nm and the reported measured pore diameters of the common commercial NF membranes are from 0.6 to 2.0 nm, including the mean pore diameter being approximately 0.8–0.9 nm. Thus, the comparatively small monosaccharides are the most affected when the total permeate flux changes due to the changes in pressure or in temperature [29]. It means that higher pressures may promote an undesired increase in monosaccharides retention, while higher temperatures apparently decreased retentions, what may be interesting for glucose and fructose, but not for FOS.

Other factor influencing nanofiltration is membrane material and pore size distribution. Goulas et al. [24] and Kuhn et al. [33] observed that membranes composed of polyethersulfone (less hydrophilic) appears to exert better saccharides separation than cellulose (more hydrophilic) membranes, as the one used in this experiment. Also, according to these authors, the small molecular size difference between FOS, glucose and fructose requires a more uniform pore size distribution to be separated.

Van der Bruggen et al. [57] affirm that, for uncharged solutes, nanofiltration membranes are characterized by a sigmoidal rejection curve as a function of molar mass, which results in an insufficient separation between different compounds on the basis of molecular size, as it is very difficult to retain one component completely and at the same time allow a second component, slightly different in size or charge, to pass completely. The same authors suggest that the use of continuous counter current integrated membrane cascades with recycle, in analogy with (conventional) separations based on thermodynamic equilibrium, may allow better separations between individual compounds, or fractionation of a mixture.

Table 8 indicates pH, electrical conductivity and soluble solids measures at NF feed, permeate and retentate. As can be seen, a slight decrease could also be observed for pH throughout the process with both nanofiltration processes; these differences again were not

considered enough for supposing microorganism multiplication. Electrical conductivity showed a slight increase in the NF without diafiltration retentate and a decrease in the diafiltration NF retentate, because of the addition of distilled water. There was not significative difference between soluble solids at feed and retentate fractions, in both experiments.

**Table 8** - pH, electrical conductivity and soluble solids at the feed, permeate and retentate of the NF-1 experiments\*

Sample	pH	Electrical conductivity (mS.cm <sup>-1</sup> at 25°C)	Soluble solids (°Brix)
<u>Without diafiltration</u>			
NF-1 Feed	7.09 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.78 ± 0.01 <sup>a</sup>	1.65 ± 0.24 <sup>a</sup>
NF-1 Permeate	6.75 ± 0.12 <sup>b</sup>	0.62 ± 0.01 <sup>b</sup>	1.13 ± 0.09 <sup>b</sup>
NF-1 Retentate	6.70 ± 0.11 <sup>b</sup>	0.81 ± 0.01 <sup>c</sup>	1.50 ± 0.00 <sup>a</sup>
<u>With diafiltration</u>			
NF-1 Feed	6.00 ± 0.04 <sup>A</sup>	1.52 ± 0.00 <sup>A</sup>	2.97 ± 0.06 <sup>A</sup>
NF-1 Permeate	5.74 ± 0.05 <sup>B</sup>	1.26 ± 0.04 <sup>B</sup>	2.03 ± 0.06 <sup>B</sup>
NF-1 Retentate	5.50 ± 0.08 <sup>C</sup>	1.45 ± 0.01 <sup>C</sup>	2.95 ± 0.05 <sup>A</sup>

\*For each group of experiments (with and without diafiltration), values on the same column with different letters are significantly different (P < 0.05)

### 3.4. Mass balance

The mass balance throughout the UF-NF process, with and without diafiltration, is shown in Table 9. After UF with diafiltration, 63.75 % of the saccharides from the initial feed were recovered in the total permeate. Yield of saccharides in the NF final retentate through the combined processes UF-NF associated to diafiltration was calculated as 50.89% for total saccharides and as 51.85 % for FOS. Increased saccharides yields on the diafiltration experiments occurred due to a higher overall saccharides initial concentration. Kamada et al. [31], in an UF-NF combined process, was able to recover 82.2% and 56.4 % of the initial saccharides in the UF permeate (20 kDa MWCO membrane) and NF retentate (1000 Da MWCO membrane), respectively.

Analyzing the nanofiltration retentate purity data, it can be noticed that the enrichment in FOS versus simple sugars was not as high as desirable. A possible reason is that FOS, glucose and fructose molecules have similar sizes and the membrane has a pore size distribution which does not allow effective fractionation of these molecules. The diafiltration process, nevertheless, allowed a slight FOS purification with a purity increase from 17.44 to 19.75 %. These results suggest that the retentions of glucose and fructose are FOS

concentration dependent. Since glucose and fructose retentions (31.6 and 18.69 %) at the diafiltration process were smaller than FOS retention (70.48 %), as discussed previously, further distilled water additions with increased permeate-volume removal may lead to improved glucose and fructose withdraw and, consequently, higher FOS purity.

**Table 9** - Mass balance throughout the ultrafiltration and nanofiltration process, without and with diafiltration: Saccharides yield ( $\text{g.kg}_{\text{yacon}}^{-1}$ ), mass (g) and purity (%) in feed, permeate and retentate fractions

		Feed			Permeate			Retentate		
		Mass	Purity	Yield	Mass	Purity	Yield	Mass	Purity	Yield
<u>Without diafiltration</u>										
<b>UF-30</b>	FOS	11.59	21.78	12.50	3.43	16.10	3.69	7.46	24.06	8.04
	Glu	19.01	35.71	20.50	7.63	35.85	8.23	11.08	35.72	11.94
	Fru	22.63	42.51	24.40	10.23	48.05	11.03	12.47	40.22	13.45
	Total	53.23	100.00	57.39	21.29	100.00	22.95	31.01	100.00	33.43
<b>NF-1</b>	FOS	3.43	16.10	3.69	0.13	7.24	0.14	3.14	16.85	3.38
	Glu	7.63	35.85	8.23	0.69	37.32	0.74	6.61	35.47	7.12
	Fru	10.23	48.05	11.03	1.02	55.44	1.10	8.88	47.68	9.58
	Total	21.29	100.00	22.95	1.84	100.00	1.98	18.63	100.00	20.08
<u>With diafiltration</u>										
<b>UF-30</b>	FOS	15.31	19.38	10.79	8.78	17.44	6.19	4.92	19.69	3.47
	Glu	28.50	36.08	20.09	18.57	36.87	13.09	8.90	35.62	6.27
	Fru	35.18	44.54	24.80	23.00	45.69	16.22	11.16	44.69	7.87
	Total	78.98	100.0	57.68	50.35	100.0	35.5	24.98	100.0	17.21
<b>NF-1</b>	FOS	8.78	17.44	6.19	0.85	8.55	0.60	7.94	19.75	5.60
	Glu	18.57	36.87	13.09	3.71	37.44	2.61	14.74	36.66	10.39
	Fru	23.00	45.69	16.22	5.35	54.01	3.77	17.52	43.59	12.35
	Total	50.35	100.0	35.50	9.90	100.0	6.98	40.19	100.0	28.33

The obtained final nanofiltration retentate, even not consisting of pure FOS, may still be applied as a functional ingredient in non-dietetic foods (because of the presence of simple sugars). Gullón et al. [58] evaluated the prebiotic potential of xylooligosaccharides (XOS) concentrates purified by membrane technology from malting industry solid waste, assessing the effect of different purity and/or molecular weight distribution. They concluded that purity of XOS concentrates did not play a significant role in fermentation, whereas the sample with shorter average degree of polymerization presented faster fermentation kinetics and led to the highest concentration of lactic acid.

#### 4. Conclusions

After UF, 63.75 % of the saccharides in the initial feed was recovered in the total permeate. Saccharides yields in the NF final retentate through the combined UF-NF processes were calculated as 50.89 % for total saccharides and as 51.85 % for FOS, with 19.75 % purity. DF did not largely influenced FOS retention in NF (it increased from 68.78 % without DF to 70.48 % with DF), but decreased glucose and fructose retentions, from 40.63 to 31.61 % and 25.64 to 18.69 %, respectively, what was desirable, allowing a greater purification of FOS at the retentate. The combined UF-NF is promising for concentrating yacon saccharides, but did not totally purified FOS, suggesting that more diafiltrations steps are required for improving preferential removal of mono and disaccharides while retaining and concentrating saccharides of higher DP in the retentate.

#### Acknowledgments

The authors thank the CNPq (National Counsel of Technological and Scientific Development) and the Research Foundation of the State of Rio Grande do Sul (FAPERGS) for financial support.

#### References

- [1] S. Kolida, G.R. Gibson, Prebiotic Capacity of Inulin-Type Fructans, *The Journal of Nutrition*, 137 (2007) 2503S-2506S.
- [2] D.J.A. Jenkins, C.W.C. Kendall, V. Vuksan, Inulin, Oligofructose and Intestinal Function, *The Journal of Nutrition*, 129 (1999) 1431.
- [3] K.M. Tuohy, S. Kolida, A.M. Lustenberger, G.R. Gibson, The prebiotic effects of biscuits containing partially hydrolysed guar gum and fructo-oligosaccharides - a human volunteer study, *British Journal of Nutrition*, 86 (2001) 341-348.
- [4] M.B. Roberfroid, Inulin-Type Fructans: Functional Food Ingredients, *The Journal of Nutrition*, 137 (2007) 2493S-2502S.
- [5] A. Franck, Technological functionality of inulin and oligofructose, *British Journal of Nutrition*, 87 (2002) S287-S291.
- [6] V.A. Rao, The prebiotic properties of oligofructose at low intake levels, *Nutrition research* (New York, N.Y.), 21 (2001) 843-848.
- [7] E. Menne, N. Guggenbuhl, Fn-type Chicory Inulin Hydrolysate Has a Prebiotic Effect in Humans, *The Journal of Nutrition*, 130 (2000) 1197-1199.

- [8] Y. Guigoz, F. Rochat, G. Perruisseau-Carrier, I. Rochat, E.J. Schiffrin, Effects of oligosaccharide on the faecal flora and non-specific immune system in elderly people, *Nutrition research (New York, N.Y.)*, 22 (2002) 13-25.
- [9] A.-J. Waligora-Dupriet, F. Campeotto, I. Nicolis, A. Bonet, P. Soulaines, C. Dupont, M.-J. Butel, Effect of oligofructose supplementation on gut microflora and well-being in young children attending a day care centre, *International Journal of Food Microbiology*, 113 (2007) 108-113.
- [10] G. Veereman, Pediatric applications of inulin and oligofructose, *Journal of Nutrition*, 137 (2007) 2585S-2589S.
- [11] L. Holloway, S. Moynihan, S.A. Abrams, K. Kent, A.R. Hsu, A.L. Friedlander, Effects of oligofructose-enriched inulin on intestinal absorption of calcium and magnesium and bone turnover markers in postmenopausal women, *British Journal of Nutrition*, 97 (2007) 365-372.
- [12] I.J. Griffin, P.M. Davila, S.A. Abrams, Non-digestible oligosaccharides and calcium absorption in girls with adequate calcium intakes, *British Journal of Nutrition*, 87 (2002) S187-S191.
- [13] I.J. Griffin, P.M.D. Hicks, R.P. Heaney, S.A. Abrams, Enriched chicory inulin increases calcium absorption mainly in girls with lower calcium absorption, *Nutrition Research*, 23 (2003) 901-909.
- [14] M.C.C.d. Souza, F.M. Lajolo, L.d.A. Martini, N.B. Correa, M.C. Dan, E.W.d. Menezes, Effect of oligofructose-enriched inulin on bone metabolism in girls with low calcium intakes, *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 53 (2010) 193-201.
- [15] N.M. Delzenne, P.D. Cani, C. Daubioul, A.M. Neyrinck, Impact of inulin and oligofructose on gastrointestinal peptides, *British Journal of Nutrition*, 93 (2005) S157-S161.
- [16] S. Seifert, B. Watzl, Inulin and Oligofructose: Review of Experimental Data on Immune Modulation, *The Journal of Nutrition*, 137 (2007) 2563S-2567S.
- [17] B. Watzl, S. Girrbach, M. Roller, Inulin, oligofructose and immunomodulation, *British Journal of Nutrition*, 93 (2005) S49-S55.
- [18] N.M. Delzenne, C. Daubioul, A. Neyrinck, M. Lasa, H.S. Taper, Inulin and oligofructose modulate lipid metabolism in animals: review of biochemical events and future prospects, *British Journal of Nutrition*, 87 (2002) S255-S259.
- [19] D. Letexier, F. Diraison, M. Beylot, Addition of inulin to a moderately high-carbohydrate diet reduces hepatic lipogenesis and plasma triacylglycerol concentrations in humans, *American Journal of Clinical Nutrition*, 77 (2003) 559-564.
- [20] I. Ojansivu, C.L. Ferreira, S. Salminen, Yacon, a new source of prebiotic oligosaccharides with a history of safe use, *Trends in Food Science & Technology*, 22 (2011) 40-46.
- [21] J. Lachman, E.C. Fernandez, M. Orsak, Yacon *Smallanthus sonchifolia* (Poepp. et Endl.) H. Robinson chemical composition and use - a review, *Plant Soil and Environment*, 49 (2003) 283-290.
- [22] A. Narai-Kanayama, N. Tokita, K. Aso, Dependence of Fructooligosaccharide Content on Activity of Fructooligosaccharide-Metabolizing Enzymes in Yacon (*Smallanthus sonchifolius*) Tuberos Roots during Storage, *Journal of Food Science*, 72 (2007) S381-S387.
- [23] J. Lachman, B. Havrland, E.C. Fernandez, J. Dudjak, Saccharides of yacon *Smallanthus sonchifolius* (Poepp. et Endl.) H. Robinson tubers and rhizomes and factors affecting their content, *Plant Soil and Environment*, 50 (2004) 383-390.

- [24] A.K. Goulas, P.G. Kapasakalidis, H.R. Sinclair, R.A. Rastall, A.S. Grandison, Purification of oligosaccharides by nanofiltration, *J. Membr. Sci.*, 209 (2002) 321-335.
- [25] R.C. Kuhn, F. Maugeri Filho, V. Silva, L. Palacio, A. Hernandez, P. Pradanos, Mass transfer and transport during purification of fructooligosaccharides by nanofiltration, *J. Membr. Sci.*, 365 (2010) 356-365.
- [26] M. Pinelo, G. Jonsson, A.S. Meyer, Membrane technology for purification of enzymatically produced oligosaccharides: Molecular and operational features affecting performance, *Separation and Purification Technology*, 70 (2009) 1-11.
- [27] I. Catarino, M. Minhalma, L.L. Beal, M. Mateus, M.N. de Pinho, Assessment of saccharide fractionation by ultrafiltration and nanofiltration, *J. Membr. Sci.*, 312 (2008) 34-40.
- [28] M. Minhalma, L.L. Beal, I. Catarino, M. Mateus, M. Norberta de Pinho, Optimization of saccharide fractionation using nanofiltration/ultrafiltration, *Desalination*, 199 (2006) 337-339.
- [29] E. Sjöman, M. Mänttari, M. Nyström, H. Koivikko, H. Heikkilä, Separation of xylose from glucose by nanofiltration from concentrated monosaccharide solutions, *J. Membr. Sci.*, 292 (2007) 106-115.
- [30] D. Nabarlantz, C. Torras, R. Garcia-Valls, D. Montané, Purification of xylo-oligosaccharides from almond shells by ultrafiltration, *Separation and Purification Technology*, 53 (2007) 235-243.
- [31] T. Kamada, M. Nakajima, H. Nabetani, S. Iwamoto, Pilot-scale study of the purification and concentration of non-digestible saccharides from yacon rootstock using membrane technology, *Food Science and Technology Research*, 8 (2002) 172-177.
- [32] T. Kamada, M. Nakajima, H. Nabetani, N. Saglam, S. Iwamoto, Availability of membrane technology for purifying and concentrating oligosaccharides, *European Food Research and Technology*, 214 (2002) 435-440.
- [33] R.C. Kuhn, L. Palacio, P. Pradanos, A. Hernandez, F. Maugeri Filho, Selection of membranes for purification of fructooligosaccharides, *Desalination and Water Treatment*, 27 (2011) 18-24.
- [34] J.T.C.L. Toneli, F.E.X. Mürr, P. Martinelli, I.M. Dal Fabbro, K.J. Park, Optimization of a physical concentration process for inulin, *Journal of Food Engineering*, 80 (2007) 832-838.
- [35] V.M. Padilha, P.M. Rolim, S.M. Salgado, A.V.S. Livera, M.G.d. Oliveira, Avaliação do tempo de secagem e da atividade de óxido-redutases de yacon (*Smallanthus sonchifolius*) sob tratamento químico, *Ciência Rural*, 39 (2009) 2178-2184.
- [36] N.K. Saha, M. Balakrishnan, M. Ulbricht, Sugarcane juice ultrafiltration: FTIR and SEM analysis of polysaccharide fouling, *J. Membr. Sci.*, 306 (2007) 287-297.
- [37] R. Liikanen, J. Yli-Kuivila, R. Laukkanen, Efficiency of various chemical cleanings for nanofiltration membrane fouled by conventionally-treated surface water, *J. Membr. Sci.*, 195 (2002) 265-276.
- [38] A.O.A.C, Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists, 14 ed., A.O.A.C. Inc., Arlington, USA, 1984.
- [39] A.O.A.C., Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists, 17 ed., A.O.A.C. Inc., Arlington, USA, 2000.



- [40] A. Zuleta, M.E. Sambucetti, Inulin determination for food labeling, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49 (2001) 4570-4572.
- [41] C.F. Scher, A. De Oliveira Rios, C.P.Z. Noreña, Hot air drying of yacon (*Smallanthus sonchifolius*) and its effect on sugar concentrations, *International Journal of Food Science & Technology*, 44 (2009) 2169-2175.
- [42] J.A. Ribeiro, Estudos Químico e Bioquímico do Yacon (*Smallanthus sonchifolius*) in natura e processado e influência do seu consumo sobre níveis glicêmicos e lipídeos fecais de ratos, in: *Food Science Department, Federal University of Lavras, Lavras, MG, Brazil, 2008*, pp. 166.
- [43] I. Manrique, A. Párraga, M. Hermann, Yacon syrup: principles and processing, in, *International Potato Center, Lima, Peru, 2005*, pp. 31.
- [44] M. Hermann, I. Freire, C. Pazos, Compositional diversity of the yacon storage root, in: *Impact on a Changing World. Program Report 1997–1998*, International Potato Center., Lima, Peru, 1999, pp. 425-432.
- [45] C. Lago, A. Bernstein, A. Brandelli, C. Noreña, Characterization of Powdered Yacon (&lt;i>Smallanthus sonchifolius) Juice and Pulp, *Food and Bioprocess Technology*, 4 (2011) 1-9.
- [46] S. Graefe, M. Hermann, I. Manrique, S. Golombek, A. Buerkert, Effects of post-harvest treatments on the carbohydrate composition of yacon roots in the Peruvian Andes, *Field Crops Research*, 86 (2004) 157-165.
- [47] K. Fukai, S. Miyazaki, F. Nanjo, Y. Hara, Distribution of carbohydrates and related enzyme-activities in yacon (*Polymnia-sonchifolia*), *Soil Science and Plant Nutrition*, 39 (1993) 567-571.
- [48] K. Fukai, S. Ohno, K. Goto, F. Nanjo, Y. Hara, Seasonal fluctuations in fructan content and related enzyme activities in yacon (*Polymnia sonchifolia*), *Soil Science and Plant Nutrition*, 43 (1997) 171-177.
- [49] M. Yazdanshenas, S.A.R. Tabatabaee-Nezhad, M. Soltanieh, R. Roostaazad, A.B. Khoshfetrat, Contribution of fouling and gel polarization during ultrafiltration of raw apple juice at industrial scale, *Desalination*, 258 (2010) 194-200.
- [50] R. van Reis, A. Zydney, Bioprocess membrane technology, *J. Membr. Sci.*, 297 (2007) 16-50.
- [51] P. Bacchin, P. Aimar, R.W. Field, Critical and sustainable fluxes: Theory, experiments and applications, *J. Membr. Sci.*, 281 (2006) 42-69.
- [52] A. Al-Amoudi, P. Williams, S. Mandale, R.W. Lovitt, Cleaning results of new and fouled nanofiltration membrane characterized by zeta potential and permeability, *Separation and Purification Technology*, 54 (2007) 234-240.
- [53] P. Fu, H. Ruiz, J. Lozier, K. Thompson, C. Spangenberg, A pilot-study on groundwater natural organics removal by low-pressure membranes, *Desalination*, 102 (1995) 47-56.
- [54] W. Song, V. Ravindran, B.E. Koel, M. Pirbazari, Nanofiltration of natural organic matter with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UV pretreatment: fouling mitigation and membrane surface characterization, *J. Membr. Sci.*, 241 (2004) 143-160.
- [55] A. Al-Amoudi, R.W. Lovitt, Fouling strategies and the cleaning system of NF membranes and factors affecting cleaning efficiency, *J. Membr. Sci.*, 303 (2007) 6-28.

- [56] R. Pedreschi, D. Campos, G. Noratto, R. Chirinos, L. Cisneros-Zevallos, Andean Yacon Root (*Smallanthus sonchifolius* Poepp. Endl) Fructooligosaccharides as a Potential Novel Source of Prebiotics, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51 (2003) 5278-5284.
- [57] B. Van der Bruggen, M. Manttari, M. Nystrom, Drawbacks of applying nanofiltration and how to avoid them: A review, *Separation and Purification Technology*, 63 (2008) 251-263.
- [58] P. Gullón, M.J. González-Muñoz, J.C. Parajó, Manufacture and prebiotic potential of oligosaccharides derived from industrial solid wastes, *Bioresource Technology*, 102 (2011) 6112-6119.

## **CAPÍTULO 3**

### **Physicochemical characterization of fructooligosaccharides-enriched powder obtained from yacon roots (*Smallanthus sonchifolius*) by membrane technology**

Artigo a ser submetido à revista Journal of Food Engineering e formatado de acordo com as normas desta revista.

**Physicochemical characterization of fructooligosaccharides-enriched saccharides powder obtained from yacon roots (*Smallanthus sonchifolius*) by membrane technology**

Institute of Food Science and Technology, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

Laboratory of Membrane Separation Processes, Chemical Engineering Department, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

**Abstract**

Fructooligosaccharides (FOS) are food ingredients applied due to combination of prebiotic benefits and interesting technological properties, being used as a sugar substitute. The knowledge of their physicochemical characteristics is important for predicting the stability of the food products where they are added. For this reason, a FOS-enriched powder extracted from yacon (*Smallanthus sonchifolius*) roots by membrane technology and freeze-dried was investigated. Color, water activity ( $a_w$ ), microstructure by Scanning Electron Microscopy coupled to Energy-dispersive X-ray Spectroscopy (SEM-EDS) and crystallinity by X-ray diffraction were evaluated. The obtained product, containing 19.75 % FOS, 36.66 % glucose and 43.59 % fructose, in weight, was a whitish granulated powder, with  $a_w$  of 0.284 and CIELAB color coordinates  $L^*$ ,  $a^*$  and  $b^*$  of  $76.25 \pm 1.19$ ,  $-1.03 \pm 0.09$  and  $1.02 \pm 0.03$ , respectively. It was highly hygroscopic and with agglomeration tendency, confirmed by the formation of bridges between particles on the SEM images. No peaks were identified at X-ray diffractograms, indicating its amorphous characteristics, but sample high hygroscopicity and formation of a rigid mass may have hampered a trustable X-ray analysis.

**Keywords:** Yacon; fructooligosaccharides; microstructure; cristallinity

## 1. Introduction

Nowadays, the strong relationship between diet and health is well accepted. In this regard, functional foods play an outstanding role. Besides exhibiting an adequate nutritional value, a food can be considered functional if it beneficially affects one or more target functions in the body in a way to prevent nutrition-related diseases or improve consumers' physical and mental well-being (Figueroa-Gonzalez et al., 2011; Siró et al., 2008). The functional foods market was estimated to reach US\$ 167 billion after 2010, with an yearly growth potential of 10 % (Granato et al., 2010).

Probiotics and prebiotics, fundamental ingredients of fermented milks and yogurts, account for the most important fraction of the overall market for functional foods (Figueroa-Gonzalez et al., 2011), probably related to the growing evidence of colonic microbiota positive influence on health (Wang, 2009). Fructooligosaccharides (FOS), also known as oligofructose, are considered prebiotic because they are not hydrolyzed by human intestinal digestive enzymes and reach the colon intact, where they are selectively fermented by probiotic bacteria like Lactobacilli and Bifidobacteria (Jenkins et al., 1999; Kolida and Gibson, 2007; Tuohy et al., 2001), contributing to a more balanced composition of intestinal microbiota (Guigoz et al., 2002; Menne and Guggenbuhl, 2000; Rao, 2001; Veereman, 2007; Waligora-Dupriet et al., 2007). They are oligomers with degree of polymerization (DP) between 3 and 10 consisting mainly of  $\beta$ -(2 $\rightarrow$ 1) fructosyl-fructose linkages, sometimes containing a starting  $\alpha$ -D-glucose moiety. It is the  $\beta$ -configuration of the anomeric C2 in their fructose monomers that affects digestibility, because human enzymes are specific for  $\alpha$ -glycosidic bonds (Kolida and Gibson, 2007; Roberfroid, 2007).

FOS are considered food ingredients and used in many food applications due to the combination of nutritional benefits and technological properties closely related to those of sugar and glucose syrups. They are highly soluble and often used in combination with high intensity sweeteners. Commercially available FOS are obtained by partial enzymatic hydrolysis of inulin extracted from chicory roots using an endo-inulinase or by synthesis from sucrose using fructosyl-transferase. They are presented as a colorless viscous syrup (75% dry substance) or a spray-dried powder (Franck, 2002). There are, however, some works evaluating their extraction from other sources, as Jerusalem artichoke (Lingyun et al., 2007; Panchev et al., 2011), dahlia tubers (Anan'ina et al., 2009) and yacon roots (Kamada et al., 2002).

Yacon (*Smallanthus sonchifolius*) is a perennial plant originated from the Andean region which roots outstand by storing carbohydrates in the form of FOS, especially 1-kestose (GF<sub>2</sub>), nystose (GF<sub>3</sub>) and 1-β-D-fructofuranosyl nystose (GF<sub>4</sub>), instead of starch (Ojansivu et al., 2011). There are also 15-40 % of simple sugars, as sucrose, fructose and glucose. Other nutrients are reported to be low except for potassium (Lachman et al., 2004). FOS extraction from yacon roots may be performed by membrane technology, a potential feasible strategy for industrial manufacture of oligosaccharides (Goulas et al., 2002; Kuhn et al., 2010) that have been used successfully by many authors for their purification (Catarino et al., 2008; Minhalma et al., 2006; Nabarlatz et al., 2007; Sjöman et al., 2007).

Commercializing FOS in the powder form has the advantage of facilitating manipulation, transport, storage and consumption. However, variations on FOS powder's moisture content may cause undesirable physical changes, as caking or agglomeration (Figueira et al., 2004). For this reason, the determination of parameters as water activity ( $a_w$ ) is important to understand the physicochemical changes mechanisms in food products and predict their stability. The caking phenomenon on a polysaccharide surface can be observed by Scanning Electron Microscopy (SEM), which allows the visualization of the formation of solid bridges between adjoining particles (Ronkart et al., 2006).

Moreover, it is well established on various well-known products, such as sucrose, trehalose, starch or dairy products, that the crystallinity degree greatly affects the stability or the utilization in many domains, e.g., food industry or pharmaceuticals (Ronkart et al., 2007). The crystallinity of the product has an impact on the flowability of the powder during storage (i.e., caking) and on its water absorption properties (Ronkart et al., 2006). Powder X-ray diffraction has been used to understand the crystallization behavior of the amorphous fraction of polysaccharides, relating it to the physical state and glass transition temperature (Kawai et al., 2011; Zimeri and Kokini, 2002).

In this way, the objective of this work was to evaluate the physicochemical characteristics of a FOS-enriched saccharides powder, obtained from yacon roots by combining ultrafiltration (UF) and nanofiltration (NF) and freeze-dried, describing its characteristics as color, microstructure and crystallinity degree and comparing them to commercial samples of FOS and inulin.

## 2. Material and methods

### 2.1. Commercial fructooligosaccharides sample

Commercial fructooligosaccharides were supplied by Beneo Orafit and, according to information provided by the manufacturer, are produced by partial enzymatic hydrolysis of chicory inulin. They were presented as a spray-dried fine white powder with purity  $\geq 93.2\%$  on dry matter (glucose + fructose + sucrose  $< 6.8\%$ ) and degree of polymerization between 2 and 8.

### 2.2. Yacon roots

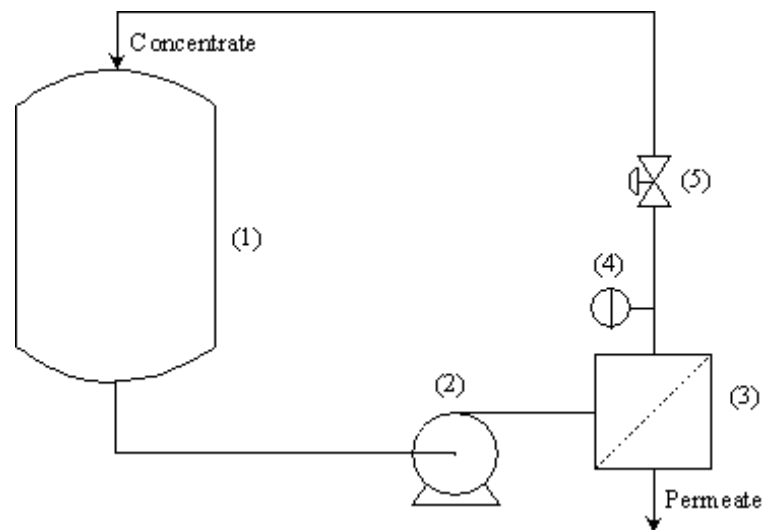
The yacon (*Smallanthus sonchifolius*) roots were cultivated in São Paulo State, Brazil, and acquired from the Supply Centre of the Rio Grande do Sul State in the city of Porto Alegre, Brazil. The roots were cleaned and selected considering the absence of visible injury and infection and were stored under refrigeration ( $8 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) until used, for no more than three weeks.

### 2.3. FOS-enriched powder production by membrane processes

The yacon extract used in the UF-NF processes was prepared in two steps, adapting the methodology described by Toneli et al. (2007). Firstly, yacon roots were sliced and kept for 20 minutes in a sodium metabisulphite 0.5% solution for minimizing yacon enzymatic darkening, adapting the method described by Padilha et al. (2009). Next, the roots were ground in a food multiprocessor and the extracted juice was kept refrigerated. After this, residual saccharides were extracted from ground roots by lixiviation, through the addition of 80 °C water in a proportion of 2 kg of water to 1 kg of ground roots. This mixture was kept at an average temperature of  $80 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  for 1 h and then filtered through a 270 mesh sieve for removing the yacon triturated roots. The two obtained yacon fractions - the juice and the liquid extracted from ground roots - were then filtered using a 1  $\mu\text{m}$  nominal pore sizes filter and mixed, resulting in the so called yacon extract.

The yacon extract was processed in two stages, combining UF and NF cross-flow processes, according to the methodology described by Kamada et al. (2002). It was first subjected to batch UF processing (30 kDa polymeric membrane, DBO Filters), recirculating

the retentate to the feed tank in order to remove large molecules such as protein, starch, fibers and suspended substances, yielding a saccharide-rich permeate. The UF-permeate was then processed by NF (1000 Da regenerated cellulose membrane, Millipore), also in a batch mode with full recycling of retentate, in order to concentrate the oligosaccharides in the retentate and reduce glucose, fructose, sucrose and salts concentration, in association with a discontinuous diafiltration (DF) mode. Experiments were performed in a pilot plant, WGM-KOCH PROTOSEP IV, shown schematically in Figure 1.



**Figure 1** - Schematic representation of the membrane bench scale unit. Legend: (1) tank, (2) pump, (3) membrane module, (4) manometer and (5) valve for pressure control.

The NF-retentate was frozen at  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$  in an ultrafreezer (Terroni, São Carlos, Brazil) and freeze-dried at  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$  and  $100\text{ }\mu\text{mHg}$  ( $13.3\text{ Pa}$ ) (LS6000 Lyophiliser, Terroni, São Carlos, Brazil). The obtained powder was kept on a desiccator until use.

#### 2.4. Saccharides content determination by HPLC

The saccharides content (FOS, glucose and fructose) in final NF-retentate was evaluated by high performance liquid chromatography (HPLC), adapting the method described by Zuleta and Sambucetti (2001) and Scher et al. (2009), using a Perkin Elmer series 200 chromatograph equipped with a refractive index detector (HPLC-RI) (PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Shelton, CT, USA) and Milli-Q water as the mobile phase at  $0.6\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , temperature of  $80\text{ }^{\circ}\text{C}$  and a Phenomenex Rezex RHM monosaccharide column,  $330\text{ mm}\cdot 7.8\text{ mm}$ , with a total run time of 14 min. The retention times were 6.766 min for



oligofructose, 9.946 min for glucose and 10.742 min for fructose. All injections were carried out in duplicate.

### 2.5. Color measurement

The color of FOS-enriched powder and of commercial inulin and FOS samples was measured directly in the powder at three different locations by using a Minolta colorimeter (Chroma Meter CR400/410) after standardization with a white calibration plate ( $L^*= 97.47$ ;  $a^*= 0.08$ ;  $b^*= 1.76$ ) (Rosell et al., 2009). The color was recorded using the tridimensional CIEL\*a\*b\* system, where  $L^*$  indicates the luminosity (varying from 9=black to 100=white),  $a^*$  is a measurement varying from green (-60) to red (+60) and  $b^*$  varies from blue (-60) to yellow (+60).

### 2.6. Scanning Electron Microscopy and Energy-dispersive X-ray Spectroscopy

The microstructures of the FOS-enriched powder and of commercial FOS were visualized by scanning electron microscopy (SEM) using the method recommended by Toneli et al. (2008), which consisted of weighting approximately one gram of sample onto double faced adhesive tape fixed to a metal stub. The samples were viewed under the equipment TM3000, Hitachi High Technologies Corporation (Tokyo, Japan) operating at 15 kV.

The microscope was equipped with the energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDS) system SwiftED3000, Oxford Instruments, allowing powders chemical characterization by elemental analysis. EDS is a technique coupled to SEM able to analyze the atomic composition of a sample and presents the advantage to permit the observation of the sample by SEM before making the analysis (Murrieta-Pazos et al., 2012).

### 2.7. Water activity ( $a_w$ )

The water activity was measured using a dew point hygrometer, Aqualab 3TE-decagon device (Pullman, USA) according to AOAC method n. 978.18 (1).

## 2.8. X-ray diffraction

X-ray diffraction analyses were performed adapting the method described by Ronkart et al. (2006), Kawai et al. (2011) and Panchev et al. (2011). Patterns of saccharides samples (in powder form) at room temperature were registered on Bruker D2 Phaser diffractometer (Bruker AXS, Karlsruhe, Germany) with Cu K $\alpha$  radiation ( $\lambda=0,5418$ ), generated by an anode device operating at 30 kV and 10 mA. X-ray diffraction spectra were collected within the  $2\theta$  range from 5° to 45° with a constant step of 0.02° and counting time of 1 s/step.

## 3. Results and discussion

### 3.1. FOS-enriched powder

The obtained FOS-enriched powder contained 19.75 % FOS, 36.66 % glucose and 43.59 % fructose, in mass. It was a whitish granulated powder, as can be observed in Figure 2, sticky, highly hygroscopic and with agglomeration tendency. The hygroscopic behavior is probably related to the high content of fructose and glucose content, reducing sugars that count for 80.25 % of the saccharides mixture in weight and are known by their hygroscopicity, mainly fructose (Davis, 1995). These sugars are responsible for strong interactions with the water molecules due to polar hydroxyl groups, that also influence solubility properties (Maia and Cal-Vidal, 1994). Commercial FOS also presented a slight hygroscopic behavior, but in much less extent, what may be related as well to the small reducing sugars content - as informed by the manufacturer, glucose, fructose and sucrose represent less than 6.8 % of the powder.

The higher water content of experimental FOS-enriched powder was confirmed by water activity measure: while yacon FOS presented  $a_w$  of 0.284, commercial chicory FOS  $a_w$  was 0.138. This result may similarly be related to the higher content of reducing sugars in experimentally obtained samples related to commercial ones. It may also be related to the drying method: Ahmed et al. (2005) observed that freeze-dried samples rapidly adsorbed moisture compared to the control sample (without freeze-drying).

Results from color measurements indicated that for experimentally obtained FOS-enriched powder the rectangular coordinates  $L^*$ ,  $a^*$  and  $b^*$  were  $76.25\pm 1.19$ ,  $-1.03\pm 0.09$  and  $1.02\pm 0.03$ , respectively. For commercial chicory FOS these values were  $96.86\pm 0.57$ ,  $-0.05\pm 0.04$  and  $0.69\pm 0.14$ , respectively. Rosell et al. (2009), measuring inulin powder color,

observed values of  $85.57 \pm 0.37$  for  $L^*$ ,  $-1.23 \pm 0.06$  for  $a^*$  and  $7.04 \pm 0.06$  for  $b^*$ . According to the color measures, yacon saccharides powder were not as white as commercial FOS neither as inulin powder evaluated by Rosell et al., due to the smaller  $L^*$  value. The negative value for  $a^*$  indicated that the experimentally obtained sugar mixture's color tend to green, and was greener than commercial FOS, due to the smaller  $a^*$  value. The positive  $b^*$  value showed that yacon saccharides tend to yellow, and were a little yellower than commercial FOS ( $>b^*$ ), but not as yellow than Rosell et al. study's inulin ( $<b^*$ ).



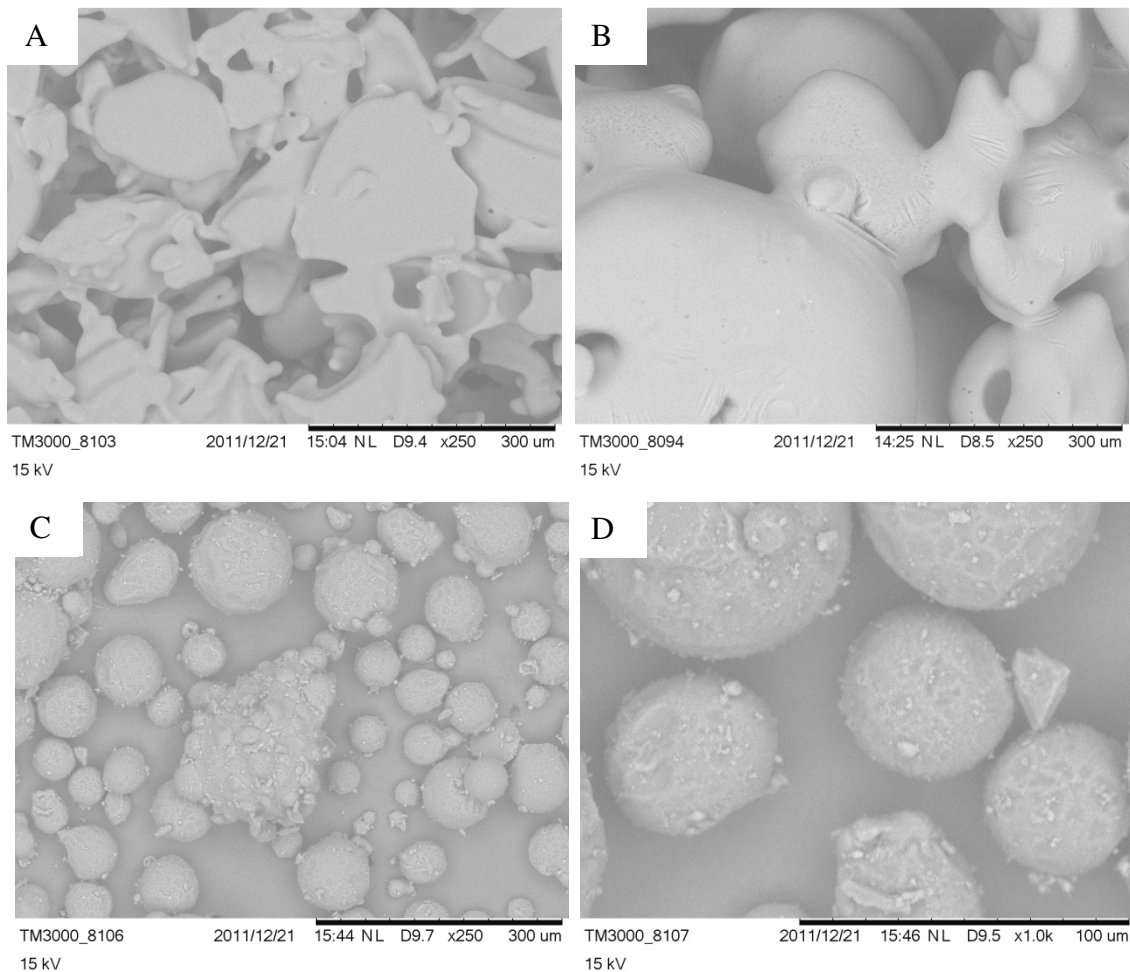
**Figure 2** – FOS-enriched powder

### 3.2. Scanning electron microscopy

The microstructure of the FOS-enriched powder and of commercial chicory FOS is shown in Figure 3. The high hygroscopicity of experimentally obtained samples, leading to agglomeration, was easily observed at microscopic images, which showed agglomerates of particles pasted ones with others. On figure 3B, after 1-week storage of yacon saccharides powder at room temperature, particles were more agglomerated than on Figure 3A, that was removed from lyophilizer at the same day SEM images were recorded. On the other hand, spray-dried commercial FOS were formed by spherical individual particles, with just a few agglomerates, as can be seen on Figure 3C, indicating smaller water adsorption. Even with magnification of x1000, it was still possible to distinguish commercial FOS single particles (Figure 3D). According to Cano-Chauca et al. (2005), the adherence of small particles into bigger ones indicates the absence of crystalline surfaces and is typical of amorphous products.

Lago et al. (2011) evaluated the microscopic structure of the powder obtained from yacon pulp and yacon juice encapsulated with native starch and air dried at 70 °C and also observed strong tendency for agglomeration. The obtained images showed that the

encapsulated yacon juice powder was formed of starch granules of variable size with mostly smooth surfaces, although some particles had a slightly wrinkled surface. A tendency for the smaller particles to agglomerate around particles of greater diameter can also be seen. Their images of yacon pulp powder revealed the presence of laminar-type structures with ‘wrinkles’, quite similar to particles of yacon FOS-enriched powder obtained in this work and shown on Figure 3A.



**Figure 3** - Electron microscopy images of yacon FOS-enriched powder (A and B) and of commercial chicory FOS (C and D). Legend: (A) FOS-enriched powder just after freeze-drying - image with magnification of  $\times 250$ ; (B) FOS-enriched powder after 1-week storage - image with magnification of  $\times 250$ ; (C) Commercial chicory FOS - image with magnification of  $\times 250$ ; (D) Commercial chicory FOS - image with magnification of  $\times 1000$ , still allowing single particles observation

Toneli et al. (2008), evaluating the effect of humidity on spray-dried chicory inulin microstructure, observed, at low humidity levels (until  $a_w$  of 0.31 and equilibrium moisture of 6.26 %), individual spherical particles, similar to images obtained at this experiment for commercial FOS (Figures 3C and 3D). As humidity was increased, these particles started to agglomerate and, when exposed to an ambient with  $a_w$  higher than 0.52, the powder became a

continuous mass, being impossible to distinguish individual particles anymore. Similarly, Ronkart et al. (2006) observed that a commercial spray-dried chicory roots inulin in the powder state was formed by amorphous spherical, that agglomerated and formed a continuous mass at  $a_w$  higher than 0.56. In addition, Toneli et al. (2008) observed a change in powder color from whitish to yellowish with the increase in humidity. The yacon FOS-enriched saccharides powder's color also presented a tendency to yellow, as was indicated by the positive  $b^*$  value of  $1.02 \pm 0.03$ .

The differences observed in obtained yacon FOS-enriched saccharides and commercial chicory FOS may also be related to the drying method. An study undertaken by Haque and Roos (2006) has shown that spray-dried and freeze-dried lactose and lactose/protein mixtures have different physical structures, thermal transitions and time-dependent lactose crystallization behavior. Spray-dried materials were round shaped particles, but freeze-dried materials resembled broken glass or had a flake-like structure. This features related in the work undertaken by Haque and Roos (2006) can be correlated to the SEM images obtained in this work, which showed spray-dried commercial FOS as spherical particles (Figures 3C and 3D), while freeze-dried yacon FOS, even agglomerated, looked more angular (Figure 3A). Ahmed et al. (2005), during microscopic examination of freeze-dried samples, observed layers of needle like void spaces previously occupied by the ice crystals formed during freezing before drying.

### *3.3. Energy-dispersive X-ray spectroscopy*

The elemental atomic qualitative composition for experimentally obtained FOS-enriched powder and commercial chicory FOS is shown in Table 1. It can be observed that commercial FOS were mainly composed of carbon and oxygen, with traces of silicon and aluminum, while experimental yacon FOS, besides carbon and oxygen, contained traces of many other elements. These components present at experimental FOS sample probably have origin on yacon roots, which contain 180-334 mg/100g fresh roots of potassium and 21-309 mg/100g fresh roots of phosphorous (Lachman et al., 2003; Ojansivu et al., 2011). Traces of sodium and sulfur may be residues of the sodium metabisulphite ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ ) solution where yacon roots were immersed for avoiding juice enzymatic browning.

**Table 1** - Atomic composition (weight %) obtained by energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDS) in experimental FOS-enriched powder and commercial chicory FOS

Atomic element	Weight (%)					
	Experimental FOS-enriched saccharides			Commercial chicory FOS		
Carbon	50.337	±	0.320	64.517	±	0.214
Oxygen	46.299	±	0.307	35.345	±	0.214
Sodium	0.186	±	0.023	-		
Magnesium	0.166	±	0.017	-		
Silicon	0.104	±	0.013	0.086	±	0.014
Phosphorus	0.218	±	0.016	-		
Sulfur	0.261	±	0.016	-		
Chlorine	0.287	±	0.017	-		
Potassium	2.140	±	0.031	-		
Aluminum	-			0.053	±	0.013

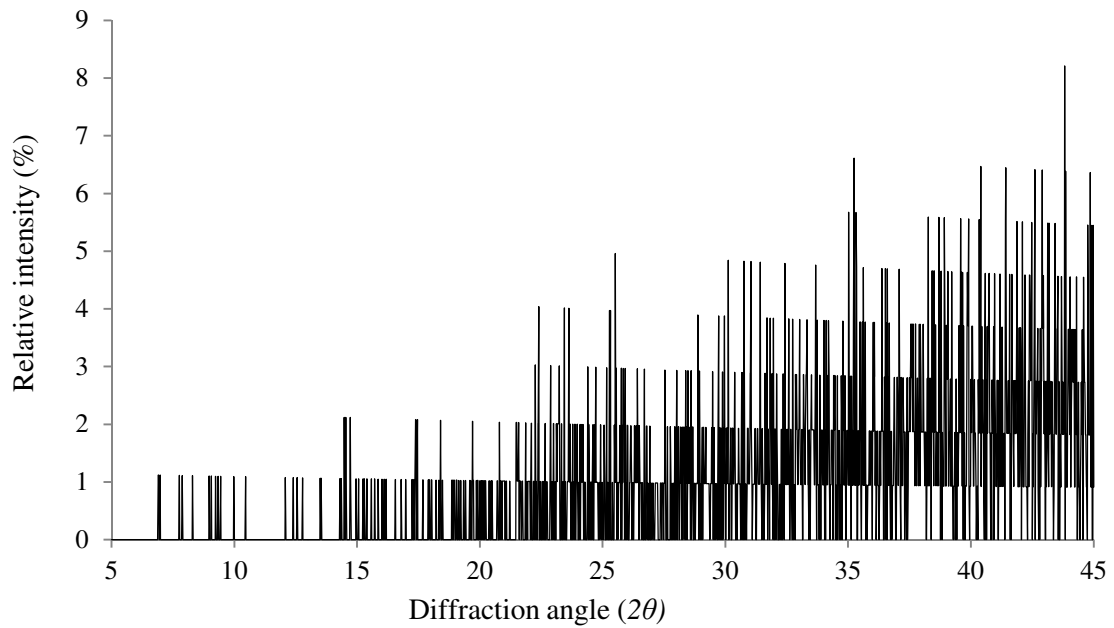
The non-negligible potassium content at the obtained yacon FOS-enriched saccharides may also have influenced the powder water sorption, in addition to the hygroscopic behavior of reducing sugars. It has been reported the hygroscopic behavior of potassium salts, which possess very rapid moisture sorption rates, reaching equilibrium in less than 10 min when exposed to 33, 52 or 75 % relative humidity (Morris et al., 1994). Omar and Roos (2007) studied the water sorption behavior of freeze-dried lactose–salt mixtures and observed that the amount of water sorbed by lactose:KCl mixtures at a 9:1 ratio was somewhat higher than that of pure lactose at 11.6–44.0% relative vapor pressure. Imtiaz-U-Islam and Langrish (2008), evaluating the effect of the KCl salt content on the water sorption and microstructure of spray-dried lactose, observed that powder particle agglomeration seemed more noticeable in lactose:KCl mixtures at 5:1 and 5:2 ratios. In SEM micrographs, the same authors noticed that, while pure lactose was formed by spherical particles with smooth surface, lactose:KCl samples have rough surfaces with sharp peaks, indicating that the salt crystals are covered by lactose. These observations lead authors to conclude that KCl slightly binds with lactose, producing amorphous products after spray drying.

### 3.4. X-ray diffraction

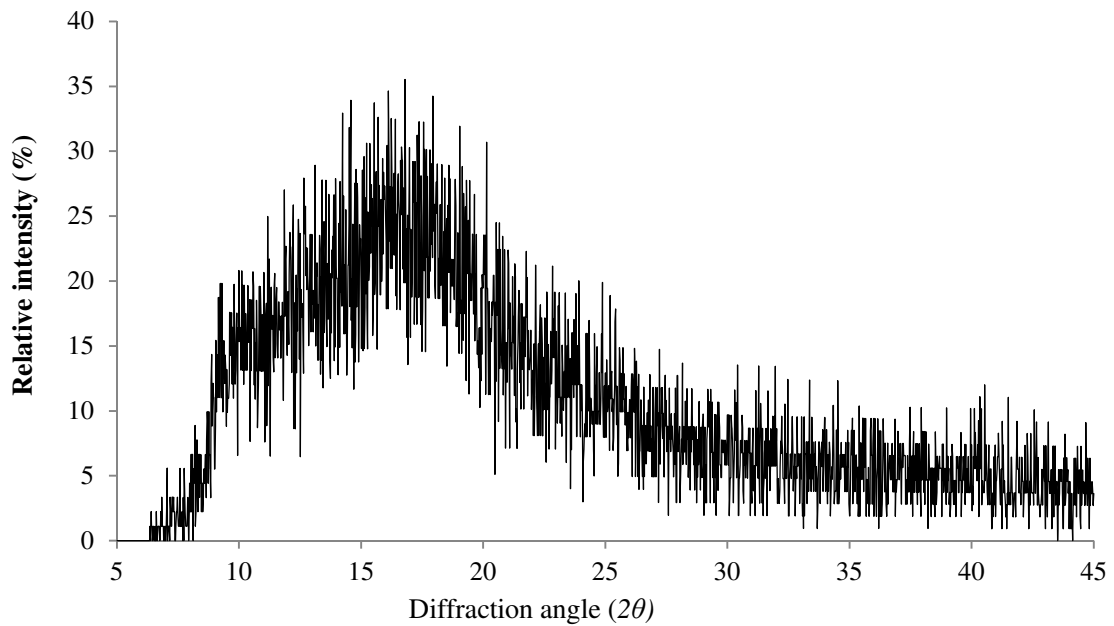
X-ray diffractograms of experimental yacon FOS-enriched powder and of commercial chicory FOS are shown in Figures 4 and 5. Commercial FOS presented a broad halo pattern with the absence of peaks, characteristic of amorphous form (Kawai et al., 2011). Yacon

FOS-enriched saccharides diffractograms also did not present any peaks, indicating its amorphous characteristics, but sample high hygroscopicity and formation of a rigid continuous mass may have hindered a trustable X-ray analysis. These results are in accordance with Kawai et al. (2011) study, in which was observed that two samples of low molecular weight inulin, with degree of polymerization (DP) of 7 and 13, were amorphous, while high molecular weight inulin (DP=27) showed some peaks in the X-ray diffractogram, indicating the existence of an ordered structure typical of a semi-crystal state. These authors noticed, however, that the diffractograms peaks disappeared when this semi-crystalline high molecular weight inulin was dissolved in water (40 % weight) and freeze-dried, indicating it turned into an amorphous state.

Similarly, Zimeri and Kokini (2002) evaluated a high molecular mass inulin from chicory roots ( $DP \geq 25$ ) and observed it was a partially crystalline material, with approximately 40 % of relative crystallinity. When it was pre-solubilized (suspended in distilled de-ionized water (40% w/w) and heated to 90°C), freeze-dried and stored at low-moisture environments ( $a_w=0$ ), its crystallinity decreased to about 1/3 its original value (~13 %). At storage at high-moisture and above its glass transition temperature  $T_g$ , nevertheless, pre-solubilized inulin recrystallized and reached the original crystallinity values of native inulin. According to Zimeri and Kokini (2002), recrystallization resulted from an increase in the system's mobility (facilitated by water), which favored reordering into a more stable crystalline structure. Panchev et al. (2011) found that X-ray diffraction patterns of high molecular inulin (DP 28-33) obtained from four varieties of Jerusalem artichoke represented a combination of amorphous and crystalline parts, with degree of crystallinity between 4 and 21 %.



**Figure 4** - X-ray diffractograms of experimental yacon FOS-enriched saccharides powder



**Figure 5** - X-ray diffractograms of commercial chicory roots FOS

The amorphous structure of the FOS-enriched powder may explain its high hygroscopicity. A relatively large amount of works reported the caking of amorphous products exposed to various water vapor pressures (Meste et al., 2002; Omar and Roos, 2007; Ronkart et al., 2006; Ronkart et al., 2009a; Ronkart et al., 2009b). According to Hartmann and Palzer (2011), crystalline substances preserve their mechanical properties with increasing humidity



until they dissolve at a substance-specific critical relative humidity of the surrounding air. Differently, on amorphous water-soluble materials, water does not dissolve particles, but migrates into the amorphous molecular matrix, having a plastifying effect on the structure, with decrease of material viscosity and elasticity (Hartmann and Palzer, 2011).

Ronkart et al. (2009a), evaluating commercial inulin dissolved in distilled water and spray-dried with air inlet temperature of 120 and 230 °C, found that the formation of a continuous mass was observed for the initial amorphous samples stored at 75–94% relative humidity, when particles appeared fused-agglomerated. They also observed that the presence of crystals in the amorphous matrix limited the advanced caking of inulins.

It is known that amorphous sucrose absorbs higher content of water than crystalline sucrose when exposed to the same relative humidity. In the crystalline state, the sugar presents a smaller probability of interacting with water molecules due to solid increased organization and rigidity, while on amorphous state, functional groups are more exposed to humidity, allowing this type of interaction (Carlos et al., 2005). The amorphous products' agglomeration process can be explained by the Bhandari and Howes (1999) assumption that low molecular weight carbohydrates with amorphous structure are very hygroscopic and can absorb water in its amorphous regions, locally depressing the glass transition temperature and accelerating the crystallization rate of that particular portion. Tight and orderly molecular packing during crystallization cannot generally accommodate excess moisture, resulting in loss of adsorbed water and absorption of this ejected moisture at the surface of neighboring particles, creating interparticulate liquid bridges and leading to 'caking'. Surrounding particles, which absorb moisture, will also be crystallized and the crystallization can proceed as a chain phenomenon (Bhandari and Howes, 1999).

#### **4. Conclusions**

The FOS-enriched powder obtained from yacon roots by membrane technology purification and freeze-dried, containing 19.75 % FOS, 36.66 % glucose and 43.59 % fructose, in weight, was a granulated whitish powder, with rectangular coordinates  $L^*$ ,  $a^*$  and  $b^*$  of  $76.25 \pm 1.19$ ,  $-1.03 \pm 0.09$  and  $1.02 \pm 0.03$ , respectively. It presented  $a_w = 0.284$  and was a very hygroscopic product, probably due to the presence of high content of reducing sugars (fructose and glucose).

The water adsorption of the experimentally obtained powder was confirmed on scanning electron microscopy images, which showed intense particles agglomeration. Just

after freeze-drying, its particles looked more angular, while a spray-dried commercial FOS evaluated for comparison presented spherical particles, what may be related to the drying method. Its amorphous structure, which also may have contributed to the high hygroscopicity, was confirmed by X-ray diffraction.

### Aknowlegdements

The authors thank the CNPq (National Counsel of Technological and Scientific Development) and the Research Foundation of the State of Rio Grande do Sul (FAPERGS) for financial support.

### References

- Ahmed, J., Ramaswamy, H.S., Khan, A.R., (2005). Effect of water activity on glass transitions of date pastes. *Journal of Food Engineering* 66(2), 253-258.
- Anan'ina, N., Andreeva, O., Mycots, L., Oganessian, E., (2009). Standardization of inulin extracted from &i>Dahlia single tubers and some physicochemical properties of inulin. *Pharmaceutical Chemistry Journal* 43(3), 157-159.
- Cano-Chauca, M., P. C. Stringheta, et al. (2005). Effect of the carriers on the microstructure of mango powder obtained by spray drying and its functional characterization. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 6(4): 420-428.
- Carlos, L. d. A., J. V. Resende, et al. (2005). Reduction of freeze-dried powder hygroscopicity by inducing crystallization in model fruit sugar solutions. *Brazilian Journal of Food Technology* 8(2): 163-173.
- Catarino, I., Minhalma, M., Beal, L.L., Mateus, M., de Pinho, M.N., (2008). Assessment of saccharide fractionation by ultrafiltration and nanofiltration. *Journal of Membrane Science* 312(1-2), 34-40.
- Davis, E., (1995). Functionality of sugars: physicochemical interactions in foods. *The American Journal of Clinical Nutrition* 62(1), 170S-177S.
- Figueira, G.M., Park, K.J., Brod, F.P.R., Honorio, S.L., (2004). Evaluation of desorption isotherms, drying rates and inulin concentration of chicory roots (*Cichorium intybus* L.) with and without enzymatic inactivation. *Journal of Food Engineering* 63(3), 273-280.
- Figuroa-Gonzalez, I., Quijano, G., Ramirez, G., Cruz-Guerrero, A., (2011). Probiotics and prebiotics - perspectives and challenges. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 91(8), 1341-1348.

- Franck, A., (2002). Technological functionality of inulin and oligofructose. *British Journal of Nutrition* 87, S287-S291.
- Goulas, A.K., Kapasakalidis, P.G., Sinclair, H.R., Rastall, R.A., Grandison, A.S., (2002). Purification of oligosaccharides by nanofiltration. *Journal of Membrane Science* 209(1), 321-335.
- Granato, D., Branco, G.F., Nazzaro, F., Cruz, A.G., Faria, J.A.F., (2010). Functional Foods and Nondairy Probiotic Food Development: Trends, Concepts, and Products. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 9(3), 292-302.
- Guigoz, Y., Rochat, F., Perruisseau-Carrier, G., Rochat, I., Schiffrin, E.J., (2002). Effects of oligosaccharide on the faecal flora and non-specific immune system in elderly people. *Nutrition research (New York, N.Y.)* 22(1), 13-25.
- Haque, M.K., Roos, Y.H., (2006). Differences in the physical state and thermal behavior of spray-dried and freeze-dried lactose and lactose/protein mixtures. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 7(1-2), 62-73.
- Hartmann, M., Palzer, S., (2011). Caking of amorphous powders — Material aspects, modelling and applications. *Powder Technology* 206(1-2), 112-121.
- Imtiaz-U-Islam, M., Langrish, T., (2008). The effect of the salt content on the crystallization behaviour and sorption fingerprints of spray-dried lactose. *Food and Bioproducts Processing* 86(C4), 304-311.
- Jenkins, D.J.A., Kendall, C.W.C., Vuksan, V., (1999). Inulin, Oligofructose and Intestinal Function. *The Journal of Nutrition* 129(7), 1431.
- Kamada, T., Nakajima, M., Nabetani, H., Iwamoto, S., (2002). Pilot-scale study of the purification and concentration of non-digestible saccharides from yacon rootstock using membrane technology. *Food Science and Technology Research* 8(2), 172-177.
- Kawai, K., Fukami, K., Thanatukorn, P., Viriyarattanasak, C., Kajiwara, K., (2011). Effects of moisture content, molecular weight, and crystallinity on the glass transition temperature of inulin. *Carbohydrate Polymers* 83(2), 934-939.
- Kolida, S., Gibson, G.R., (2007). Prebiotic Capacity of Inulin-Type Fructans. *The Journal of Nutrition* 137(11), 2503S-2506S.
- Kuhn, R.C., Maugeri Filho, F., Silva, V., Palacio, L., Hernandez, A., Pradanos, P., (2010). Mass transfer and transport during purification of fructooligosaccharides by nanofiltration. *Journal of Membrane Science* 365(1-2), 356-365.
- Lachman, J., Fernandez, E.C., Orsak, M., (2003). Yacon *Smallanthus sonchifolia* (Poepp. et Endl.) H. Robinson chemical composition and use - a review. *Plant Soil and Environment* 49(6), 283-290.

- Lachman, J., Havrland, B., Fernandez, E.C., Dudjak, J., (2004). Saccharides of yacon *Smallanthus sonchifolius* (Poepp. et Endl.) H. Robinson tubers and rhizomes and factors affecting their content. *Plant Soil and Environment* 50(9), 383-390.
- Lago, C., Bernstein, A., Brandelli, A., Noreña, C., (2011). Characterization of Powdered Yacon (*Smallanthus sonchifolius*) Juice and Pulp. *Food and Bioprocess Technology* 4, 1-9.
- Lingyun, W., Jianhua, W., Xiaodong, Z., Da, T., Yalin, Y., Chenggang, C., Tianhua, F., Fan, Z., (2007). Studies on the extracting technical conditions of inulin from Jerusalem artichoke tubers. *Journal of Food Engineering* 79(3), 1087-1093.
- Maia, M.C.A., Cal-Vidal, J., (1994). Kinetics of water uptake by citrus juices in powder form. *International Journal of Food Science & Technology* 29(2), 137-141.
- Menne, E., Guggenbuhl, N., (2000). Fn-type Chicory Inulin Hydrolysate Has a Prebiotic Effect in Humans. *The Journal of Nutrition* 130(5), 1197-1199.
- Meste, M.L., Champion, D., Roudaut, G., Blond, G., Simatos, D., (2002). Glass Transition and Food Technology: A Critical Appraisal. *Journal of Food Science* 67(7), 2444-2458.
- Minhalma, M., Beal, L.L., Catarino, I., Mateus, M., Norberta de Pinho, M., (2006). Optimization of saccharide fractionation using nanofiltration/ultrafiltration. *Desalination* 199(1-3), 337-339.
- Morris, K.R., Fakes, M.G., Thakur, A.B., Newman, A.W., Singh, A.K., Venit, J.J., Spagnuolo, C.J., Serajuddin, A.T.M., (1994). An integrated approach to the selection of optimal salt form for a new drug candidate. *International Journal of Pharmaceutics* 105(3), 209-217.
- Murrieta-Pazos, I., Gaiani, C., Galet, L., Scher, J., (2012). Composition gradient from surface to core in dairy powders: Agglomeration effect. *Food Hydrocolloids* 26(1), 149-158.
- Nabarlatz, D., Torras, C., Garcia-Valls, R., Montané, D., (2007). Purification of xylo-oligosaccharides from almond shells by ultrafiltration. *Separation and Purification Technology* 53(3), 235-243.
- Ojansivu, I., Ferreira, C.L., Salminen, S., (2011). Yacon, a new source of prebiotic oligosaccharides with a history of safe use. *Trends in Food Science & Technology* 22(1), 40-46.
- Omar, A.M.E., Roos, Y.H., (2007). Water sorption and time-dependent crystallization behaviour of freeze-dried lactose-salt mixtures. *LWT - Food Science and Technology* 40(3), 520-528.
- Padilha, V.M., Rolim, P.M., Salgado, S.M., Livera, A.V.S., Oliveira, M.G.d., (2009). Avaliação do tempo de secagem e da atividade de óxido-redutases de yacon (*Smallanthus sonchifolius*) sob tratamento químico. *Ciência Rural* 39, 2178-2184.

- Panchev, I., Delchev, N., Kovacheva, D., Slavov, A., (2011). Physicochemical characteristics of inulins obtained from Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.). *European Food Research and Technology* 233(5), 889-896.
- Rao, V.A., (2001). The prebiotic properties of oligofructose at low intake levels. *Nutrition research (New York, N.Y.)* 21(6), 843-848.
- Roberfroid, M.B., (2007). Inulin-Type Fructans: Functional Food Ingredients. *The Journal of Nutrition* 137(11), 2493S-2502S.
- Ronkart, S., Blecker, C., Fougnyes, C., Van Herck, J.C., Wouters, J., Paquot, M., (2006). Determination of physical changes of inulin related to sorption isotherms: An X-ray diffraction, modulated differential scanning calorimetry and environmental scanning electron microscopy study. *Carbohydrate Polymers* 63(2), 210-217.
- Ronkart, S., Deroanne, C., Paquot, M., Fougnyes, C., Lambrechts, J.-C., Blecker, C., (2007). Characterization of the Physical State of Spray-Dried Inulin. *Food Biophysics* 2(2), 83-92.
- Ronkart, S.N., Paquot, M., Blecker, C.S., Fougnyes, C., Doran, L., Lambrechts, J.C., Norberg, B., Deroanne, C., (2009a). Impact of the Crystallinity on the Physical Properties of Inulin during Water Sorption. *Food Biophysics* 4(1), 49-58.
- Ronkart, S.N., Paquot, M., Fougnyes, C., Deroanne, C., Blecker, C.S., (2009b). Effect of water uptake on amorphous inulin properties. *Food Hydrocolloids* 23(3), 922-927.
- Rosell, C.M., Santos, E., Collar, C., (2009). Physico-chemical properties of commercial fibres from different sources: A comparative approach. *Food Research International* 42(1), 176-184.
- Scher, C.F., De Oliveira Rios, A., Noreña, C.P.Z., (2009). Hot air drying of yacon (*Smallanthus sonchifolius*) and its effect on sugar concentrations. *International Journal of Food Science & Technology* 44(11), 2169-2175.
- Siró, I., Kápolna, E., Kápolna, B., Lugasi, A., (2008). Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance—A review. *Appetite* 51(3), 456-467.
- Sjöman, E., Mänttari, M., Nyström, M., Koivikko, H., Heikkilä, H., (2007). Separation of xylose from glucose by nanofiltration from concentrated monosaccharide solutions. *Journal of Membrane Science* 292(1-2), 106-115.
- Toneli, J.T.C.L., Mürr, F.E.X., Martinelli, P., Dal Fabbro, I.M., Park, K.J., (2007). Optimization of a physical concentration process for inulin. *Journal of Food Engineering* 80(3), 832-838.
- Toneli, J.T.d.C.L., Park, K.J., Murr, F.E.X., Negreiros, A.A., (2008). Efeito da umidade sobre a microestrutura da inulina em pó. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 28, 122-131.

- Tuohy, K.M., Kolida, S., Lustenberger, A.M., Gibson, G.R., (2001). The prebiotic effects of biscuits containing partially hydrolysed guar gum and fructo-oligosaccharides - a human volunteer study. *British Journal of Nutrition* 86(3), 341-348.
- Veereman, G., (2007). Pediatric applications of inulin and oligofructose. *Journal of Nutrition* 137(11), 2585S-2589S.
- Waligora-Dupriet, A.-J., Campeotto, F., Nicolis, I., Bonet, A., Soulaines, P., Dupont, C., Butel, M.-J., (2007). Effect of oligofructose supplementation on gut microflora and well-being in young children attending a day care centre. *International Journal of Food Microbiology* 113(1), 108-113.
- Wang, Y., (2009). Prebiotics: Present and future in food science and technology. *Food Research International* 42(1), 8-12.
- Zimeri, J.E., Kokini, J.L., (2002). The effect of moisture content on the crystallinity and glass transition temperature of inulin. *Carbohydrate Polymers* 48(3), 299-304.
- Zuleta, A., Sambucetti, M.E., (2001). Inulin determination for food labeling. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49(10), 4570-4572.

## **CAPÍTULO 4**

### **DISCUSSÃO GERAL**

## DISCUSSÃO GERAL

Após a execução dos experimentos e o cumprimento dos objetivos gerais e específicos deste trabalho de dissertação, os resultados obtidos foram apresentados na forma de dois artigos científicos listados a seguir:

- 1) Concentração e purificação de frutooligossacarídeos a partir da raiz de yacon (*Smallanthus sonchifolius*) utilizando tecnologia de separação por membranas.
- 2) Caracterização físico-química de pó liofilizado enriquecido em frutooligossacarídeos obtido a partir da raiz de yacon (*Smallanthus sonchifolius*) através da tecnologia de separação por membranas.

Inicialmente foi avaliada a composição do extrato de yacon utilizado nos processos de separação por membranas. Para esse fim, as raízes de yacon foram descascadas e imersas por 20 minutos em solução contendo 0,5 % de metabissulfito de sódio, para minimizar o escurecimento enzimático, conforme indicado por Padilha et al. (2009), que obteve bons resultados com uma solução com 0,5 % de metabissulfito de potássio. As raízes foram então trituradas em um processador e o suco extraído foi separado e mantido sob refrigeração. Os sacarídeos ainda presentes nas raízes trituradas foram removidos por lixiviação, através da adição de água a  $80 \pm 2$  °C numa proporção de 2:1 (massa água:massa raízes), durante uma hora. A seguir, foi realizada filtração em peneira de 270 mesh para remover as partículas maiores. O suco de yacon e o líquido extraído das raízes lixiviadas foram misturados e filtrados através de papéis filtros de 1 e 22  $\mu\text{m}$ , resultando no denominado “extrato de yacon”, cujas características estão descritas na Tabela 1 do Capítulo 2. Os valores de pH para o suco e o extrato de yacon foram  $6,09 \pm 0,07$  e  $6,03 \pm 0,07$ , respectivamente, semelhante ao valor obtido por Scher et al. (2009), de  $6,09 \pm 0,01$ , ao avaliar as raízes de yacon *in natura* com a mesma origem das usadas neste experimento.



**Tabela 1** – Características do suco de yacon, do líquido extraído das raízes lixiviadas e do extrato de yacon: pH, sólidos solúveis (°Brix) e teor de açúcares (g/100g matéria seca)

Parâmetro	Suco de yacon	Líquido extraído das raízes lixiviadas	Extrato de yacon
pH	6,09 ± 0,07	5,64 ± 0,03	6,03 ± 0,07
Sólidos solúveis	8,50 ± 0,00	3,42 ± 0,29	7,50 ± 0,00
Conteúdo de FOS	8,12 ± 0,06	1,72 ± 0,01	10,55 ± 0,02
Conteúdo de glicose	14,89 ± 0,13	2,66 ± 0,06	17,30 ± 0,03
Conteúdo de frutose	18,52 ± 0,03	2,91 ± 0,02	20,60 ± 0,01
Umidade raízes de yacon (%)	88,16 ± 0,20		

Com relação ao teor de sólidos solúveis, o suco de yacon apresentou 8,5 °Brix, de acordo com valores relatados por Manrique et al. (2005), de 8 a 12 °Brix para as raízes de yacon, e um pouco menor do que os valores encontrados por Scher et al. (2009), de 9,9±0,01 °Brix. Os sólidos solúveis do extrato de yacon, de 7,5 °Brix, diminuíram devido à adição do líquido extraído por lixiviação.

Os teores de açúcares do extrato de yacon, em base seca, foram 10,55 ± 0,02 g por 100 g de matéria seca (m.s.) para FOS, 17,30 ± 0,03 g por 100 g m.s. para glicose e 20,60 ± 0,01 g por 100 g m.s. para frutose. A lixiviação com água quente a partir de raízes de yacon trituradas representou um aumento no teor de FOS, glicose e frutose presentes no extrato de yacon de 21,23%, 17,89% e 15,70%, respectivamente. Lago et al. (2011) obtiveram valores de 1,07 ± 0,18, 3,30 ± 0,28 e 2,99 ± 0,18 g por 100 g m.s. de FOS, glicose e frutose no suco de yacon e de 3,15 ± 0,16, 10,98 ± 0,32 e 4,30 ± 0,57 g por 100 g m.s. de FOS, glicose e frutose, respectivamente, na polpa (raízes trituradas após a extração do suco). A comparação do teor de açúcares presente no yacon com outros experimentos pode ser dificultada devido aos diversos fatores que influenciam seu conteúdo, como ano e/ou método de cultivo e cuidados durante o pós-colheita e o armazenamento (GRAEFE et al., 2004).

Após caracterização, o extrato de yacon foi submetido à ultrafiltração (UF) utilizando membranas poliméricas de massa molar de corte de 10 kDa (UF-10) e 30 kDa (UF-30), para remoção de partículas em suspensão tais como proteínas e lipídeos, mas permitindo a passagem dos açúcares através da membrana e recolhendo-os no permeado. Avaliando-se o fluxo permeado, observou-se que, em ambas as membranas, o fluxo permeado de água aumentou linearmente com a pressão transmembrana, enquanto o fluxo permeado de extrato de yacon foi significativamente menor que o da água nas mesmas condições operacionais, conforme ilustrado na Figura 2 do Capítulo 2. Este resultado indica que o efeito da polarização por concentração é significativo para o extrato de yacon e que este efeito tende a

aumentar em altas pressões transmembrana (PTM). Tal fenômeno ocorre quando a concentração de solutos na região próxima à superfície da membrana torna-se superior à observada no seio da solução que está sendo filtrada, criando um gradiente de concentração que é parcialmente compensado pela difusão destes solutos no sentido contrário ao do solvente que permeia a membrana (YAZDANSHENAS et al., 2010).

A polarização por concentração não pode ser completamente evitada, mas sua extensão pode ser controlada aplicando baixas pressões e altas taxas de cisalhamento na superfície das membranas (BACCHIN et al., 2006; VAN REIS; ZYDNEY, 2007). Com base nos fluxos permeados de água e de extrato de yacon para as membranas UF-10 e UF-30, foi observado que, em pressões menores que 1,5 bar, o fluxo permeado de extrato de yacon tornou-se independente da pressão, indicando que o fluxo limite foi atingido. As curvas de fluxo permeado de extrato de yacon também foram utilizadas para determinar o fluxo crítico, considerado o máximo fluxo possível para minimizar o *fouling* e a polarização por concentração. Este fluxo foi determinado traçando uma linha passando pela origem e identificando o ponto em que a curva de fluxo permeado de extrato de yacon tornou-se não linear. Deste modo, foi selecionada a pressão de operação de 0,75 bar para a ultrafiltração, por ser a maior PTM possível para minimizar a polarização por concentração e ainda fornecer valores aceitáveis de fluxo permeado.

O processo foi conduzido com reciclo do retido para o tanque de alimentação até que o volume inicial da solução de alimentação fosse reduzido pela metade, atingindo um fator de concentração igual a dois. Devido ao líquido retido nas tubulações do sistema de ultrafiltração (volume morto), esse foi o maior fator de concentração possível antes que o volume dentro do tanque de alimentação diminuísse a ponto de impossibilitar a sucção pela bomba. A 0,75 bar, o processo de ultrafiltração durou em torno de 200 minutos para a membrana UF-30 e 310 minutos para a UF-10, observando-se a diminuição nos fluxos permeados de 15,3 para 13,8 e de 27,6 para 24,3 L.m<sup>-2</sup>.h<sup>-1</sup> para as membranas UF-10 e UF-30, respectivamente. Kamada et al. (2002a) observaram uma significativa diminuição do fluxo permeado de extrato de yacon, de 42 para 12 L.m<sup>-2</sup>.h<sup>-1</sup>, durante a UF com uma membrana de 20 kDa, o que pode ser explicado pelo maior fator de concentração utilizado por estes pesquisadores, que conduziram o processo até que o volume final de retido correspondesse a apenas 3,3 % do volume inicial da solução de alimentação.

A formação de *fouling* durante o processo de ultrafiltração foi estimada por meio das curvas de fluxo permeado de água antes e após a ultrafiltração, ilustradas nas Figuras 3 e 4 do Capítulo 2, avaliando dois filtros utilizados no pré-tratamento do extrato de yacon, de 1 µm e

de 22  $\mu\text{m}$ . Este problema – comum a todos os tipos de separação por membranas – surge a partir da formação de depósitos na superfície externa da membrana e/ou por adsorção nos poros da membrana, promovendo bloqueio ou redução do diâmetro efetivo dos poros (VAN REIS; ZYDNEY, 2007). Observou-se que o *fouling* foi significativamente menor com a utilização do pré-filtro de 1  $\mu\text{m}$ , em comparação com o de 22  $\mu\text{m}$ , sendo reduzido de 68,67 para 26,95 % para a membrana UF-10 e de 52,66 para 16,16 % para a UF-30, indicando que o pré-filtro de 1  $\mu\text{m}$  foi mais eficiente na remoção de partículas em suspensão do extrato de yacon que causaram o rápido entupimento de poros da membrana.

A eficácia do protocolo de limpeza (descrito no Anexo A) também foi avaliada por meio do fluxo permeado de água antes da ultrafiltração e após a limpeza. A recuperação do fluxo permeado de água foi parcial para a membrana UF-10 (81-82%), mas total para a UF-30, que apresentou maior fluxo permeado de água após a limpeza, em comparação com o da membrana compactada antes da UF. Isto pode ter sido causado pela descompactação da membrana UF-30, pois o fluxo permeado retornou aos valores originais após uma nova compactação. Fu et al. (1995) constataram que duas membranas de nanofiltração necessitaram de protocolos de limpeza diferentes, mesmo quando utilizando a mesma solução de alimentação, devido a diferentes interações da solução com o material e a estrutura das membranas.

A retenção de açúcares nos processos de ultrafiltração com as membranas UF-10 e UF-30 está indicada na Tabela 2, traçando uma comparação entre os pré-filtros de 1 e 22  $\mu\text{m}$  e relacionando estes resultados com o *fouling*. A ultrafiltração do extrato de yacon pré-tratado com o filtro de 22  $\mu\text{m}$  apresentou retenções significativamente maiores para FOS, glicose e frutose que as observadas com o filtro de 1  $\mu\text{m}$ , especialmente no caso da membrana UF-30. O aumento da retenção observada pode ter sido causado pela remoção insuficiente dos sólidos em suspensão pelo filtro de 22  $\mu\text{m}$ , levando ao aumento da polarização por concentração e do *fouling*. Como também pode ser observado na Tabela 2, a extensão do *fouling* foi maior com o pré-filtro de 22  $\mu\text{m}$  para ambas as membranas. A partir de tais resultados, nos experimentos com membranas posteriores utilizou-se exclusivamente o filtro de 1  $\mu\text{m}$  como pré-tratamento do extrato de yacon.

**Tabela 2** – Formação de *fouling* e retenção de FOS, glicose e frutose para as membranas UF-10 e UF-30 com os pré-filtros de 1 e 22  $\mu\text{m}$ 

	UF-10		UF-30	
	22 $\mu\text{m}$	1 $\mu\text{m}$	22 $\mu\text{m}$	1 $\mu\text{m}$
Retenção de FOS (%)	27,00	22,35	47,80	14,77
Retenção de glicose (%)	13,95	5,36	18,90	0,42
Retenção de frutose (%)	17,70	6,10	25,14	1,65
<i>Fouling</i> (%)	68,67	26,95	52,66	16,16

A retenção observada dos FOS utilizando a membrana UF-30 (14,77 %) foi menor do que com a membrana UF-10 (22,35 %), conforme esperado devido à sua maior massa molar de corte. O mesmo foi observado para glicose e frutose. Considerando que altos fluxos permeados são desejáveis para melhorar a eficiência do processo e que baixas retenções de FOS na UF levarão a maiores teores finais de FOS purificados, para os experimentos de nanofiltração foi utilizado apenas o permeado da membrana UF-30 pré-tratado com o filtro de 1  $\mu\text{m}$ .

Realizou-se a nanofiltração visando remover, no permeado, sais e açúcares simples, como glicose e frutose, concentrando consequentemente os FOS no retido. Não foi observado *fouling* durante este processo, já que não houve diferenças nas medidas de fluxo permeado de água antes e após a nanofiltração. O mesmo resultado foi encontrado por Goulas et al. (2002) durante a nanofiltração de uma mistura de galacto-oligossacarídeos comerciais. Também foi possível observar que o emprego da diafiltração não influenciou na retenção de FOS (esta aumentou de 68,78%, sem diafiltração, para 70,48 %, com diafiltração), mas diminuiu as retenções de glicose e frutose, de 40,63 para 31,61 % e de 25,64 para 18,69 %, respectivamente. Uma menor retenção dos monossacarídeos era desejável, pois permitiria maior purificação dos FOS no retido.

Kuhn et al. (2011) empregaram NF sem diafiltração em uma mistura de açúcares contendo FOS, glicose, frutose e sacarose, usando membrana com massa molar de corte de 1000 Da e 18 bar de pressão transmembrana, e obtiveram retenções de 64 %, 28 % e 31 % para FOS, glicose e frutose, respectivamente. Kamada et al. (2002a), durante a nanofiltração de uma mistura de sacarídeos provenientes da raiz de yacon, previamente clarificados por UF (membrana de 20 kDa), observaram retenções de 14,0 % para monossacarídeos, 46,2 % para dissacarídeos, 80,9 % para trissacarídeos e 91,5-99,9 % para sacarídeos com  $\text{GP} \geq 4$ , com uma membrana de 1000 Da e pressão de 50 bar.

A diferença menos significativa do que esperada entre a retenção observada dos FOS e dos açúcares simples, especialmente na NF sem diafiltração, pode ser parcialmente explicada

pelo baixo grau de polimerização (GP) dos oligossacarídeos do yacon. Em estudo realizado por Pedreschi et al. (2003) sobre o consumo seletivo de sacarídeos do yacon por cepas probióticas de *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*, concluiu-se que o yacon é composto por 27 % de frutanas do tipo GF<sub>2</sub>, 54 % de GF<sub>3</sub> e 19 % de moléculas do tipo GF<sub>n≥4</sub>. Ou seja, 81 % dos FOS presentes no yacon são oligômeros de cadeia curta, com apenas duas ou três unidades frutose polimerizadas, possuindo pequena diferença de massa molar em relação a frutose e glicose.

Van der Bruggen, Mänttari e Nyström (2008) afirmam que, para solutos sem carga, membranas de nanofiltração são caracterizadas por uma curva sigmoide de rejeição em função da massa molar, o que resulta em uma separação insuficiente entre diferentes compostos com base no tamanho molecular, pois é difícil reter completamente um componente e, ao mesmo tempo, permitir a passagem total de um segundo componente, que possui somente pequena diferença de tamanho ou de carga. Outros fatores que influenciam a nanofiltração são o material da membrana e a distribuição do tamanho de poros da membrana. Goulas et al. (2002) e Kuhn et al. (2011) observaram que membranas compostas de polietersulfona (menos hidrofílicas) parecem exercer uma melhor separação de sacarídeos que as de celulose (mais hidrofílicas), como a utilizada neste experimento. Ainda segundo esses autores, a pequena diferença de tamanho entre FOS, glicose e frutose exige uma distribuição de tamanho de poros na membrana mais uniforme para permitir a separação.

O balanço de massa indicou que, depois da UF, 63,75 % dos sacarídeos presentes na solução de alimentação inicial foram recuperados no permeado. O rendimento dos sacarídeos no retido final da NF associada à diafiltração, ao longo do processo combinado de UF-NF, foi calculado em 50,89 % para sacarídeos totais e 51,85 % para FOS. Kamada et al. (2002a), em um processo combinado de UF-NF, conseguiram recuperar 82,2 % dos sacarídeos iniciais no permeado da UF (membrana de 20 kDa) e 56,4 % no retido da NF (membrana de 1000 Da).

Conforme indicado na Tabela 9 do Capítulo 2, o enriquecimento em FOS frente aos açúcares simples não foi tão alto quanto o desejado. Uma possível razão é o tamanho semelhante das moléculas de FOS, glicose e frutose, que não conseguem ser efetivamente fracionadas pela distribuição de tamanho de poros da membrana. Entretanto, a associação de diafiltração à nanofiltração proporcionou um ligeiro aumento na pureza dos FOS, de 17,44 para 19,75 %. Estes resultados, discutidos mais detalhadamente no Capítulo 2, sugerem que, como as retenções observadas de glicose e frutose (31,6 e 18,69 %) no processo com diafiltração foram menores do que a retenção de FOS (70,48 %), etapas adicionais de

diafiltração, com maior volume de permeado removido, poderiam diminuir a concentração de glicose e frutose no retido e, conseqüentemente, aumentar a pureza dos FOS.

O retido da nanofiltração, mesmo que não consista de FOS puros, ainda pode ser aplicado como um ingrediente funcional em alimentos, desde que não sejam destinados a diabéticos, devido à presença de açúcares simples. Gullón et al. (2011) avaliaram o potencial prebiótico de um concentrado de xilooligossacarídeos (XOS) purificado por tecnologia de separação por membranas a partir de resíduos sólidos da indústria de malte, investigando o efeito de diferentes graus de pureza e/ou distribuição de massa molecular. Os pesquisadores concluíram que a pureza do concentrado de XOS não desempenhou um papel significativo na fermentação pelas bactérias probióticas, enquanto que a amostra com menor grau médio de polimerização apresentou uma cinética de fermentação mais rápida e ocasionou uma maior concentração de ácido láctico.

Considerando que os frutooligossacarídeos comerciais estão usualmente disponíveis em forma de pó, o retido obtido no processo de nanofiltração associado à diafiltração, contendo 19,75 % de FOS, 36,66 % de glicose e 43,59 % de frutose, em massa, foi seco por liofilização. Conforme descrito no Capítulo 3, o pó obtido foi caracterizado por meio de análises de cor, atividade de água ( $a_w$ ), microestrutura e cristalinidade, e comparado a um frutooligossacarídeo comercial que, segundo especificações técnicas do fabricante, é obtido pela hidrólise parcial da inulina extraída da raiz de chicória e seco por atomização. O produto comercial apresenta-se como um pó fino e branco, com teor de FOS  $\geq 93,2$  % em matéria seca, concentração de glicose, frutose e sacarose menor que 6,8 % e com grau de polimerização entre 2 e 8.

Após liofilização, foi obtido um pó granulado e esbranquiçado, altamente higroscópico e com tendência a aglomeração e pegajosidade. Este comportamento provavelmente está relacionado ao alto teor de frutose e glicose, açúcares redutores que respondem por 80,25 % da mistura de sacarídeos em massa e são conhecidas por sua higroscopicidade, principalmente a frutose (DAVIS, 1995). Estes açúcares são responsáveis por fortes interações com as moléculas de água devido aos grupos terminais polares hidroxil, que também influenciam as propriedades de solubilidade (MAIA; CAL-VIDAL, 1994).

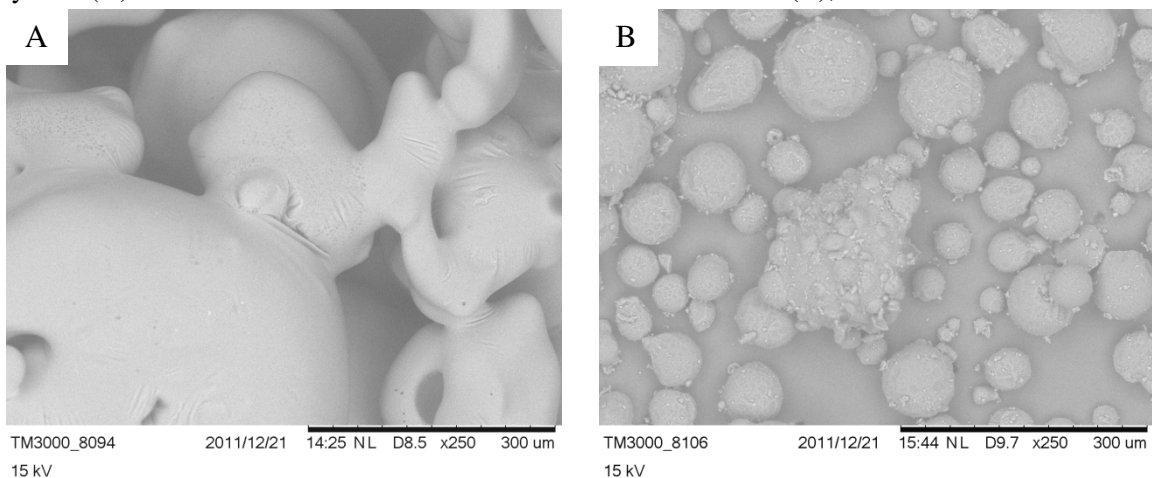
Os FOS comerciais apresentaram um comportamento ligeiramente higroscópico, porém muito menor que a amostra obtida por liofilização, o que também está relacionado ao conteúdo de açúcares redutores – conforme informado pelo fabricante, a concentração de glicose, frutose e sacarose é menor que 6,8 %. A atividade de água da amostra liofilizada provenientes do yacon foi 0,284, e dos FOS comerciais foi 0,138. Este resultado pode

igualmente ser relacionado ao maior teor de açúcares redutores na amostra obtida experimentalmente, mas também pode estar relacionado com o método de secagem: Ahmed, Ramaswamy e Khan (2005) observaram que amostras liofilizadas absorviam umidade mais rapidamente que as amostras controle (sem liofilização).

A medição de cor da amostra liofilizada indicou coordenadas retangulares  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$  iguais a  $76,25 \pm 1,19$ ,  $-1,03 \pm 0,09$  e  $1,02 \pm 0,03$ , respectivamente. Para os FOS comerciais, os respectivos valores foram  $96,86 \pm 0,57$ ,  $-0,05 \pm 0,04$  e  $0,69 \pm 0,14$ . O valor de  $a^*$  negativo indica a coloração esverdeada da amostra liofilizada, que se apresentou mais verde do que os FOS comerciais (menor  $a^*$ ). O valor positivo para  $b^*$  indica que a amostra liofilizada tendeu ao amarelo e apresentou-se mais amarelada do que os FOS comerciais (maior  $b^*$ ).

A microestrutura da amostra liofilizada proveniente do yacon e dos FOS comerciais atomizados oriundos da chicória, visualizada através de microscópio eletrônico de varredura (MEV), é mostrada na Figura 1. A alta higroscopicidade da amostra liofilizada, levando à aglomeração, foi nitidamente observada nas imagens microscópicas, que mostraram partículas coladas umas as outras. Por outro lado, os FOS comerciais atomizados apresentaram-se como partículas esféricas individuais, com apenas poucos aglomerados, indicando menor adsorção de água. Ao avaliar o efeito da umidade em inulina proveniente da chicória e seca por atomização, Toneli et al. (2008) e Ronkart et al. (2006) também observaram partículas individuais esféricas em baixas umidades que, porém, se aglomeraram e formaram uma massa contínua em ambientes com  $a_w$  superiores a 0,5.

**Figura 1** – Imagens de microscópio eletrônico de varredura da amostra liofilizada proveniente do yacon (A) e dos FOS comerciais atomizados oriundos da chicória (B), com aumentos de x250.



A composição elementar qualitativa da amostra liofilizada originária do yacon e dos FOS comerciais foi determinada por espectroscopia de energia dispersiva de raios-X,

indicando que ambos eram formados principalmente por carbono e oxigênio. Porém, enquanto os FOS comerciais continham traços de apenas silício e alumínio, a amostra obtida experimentalmente continha traços de muitos outros elementos, como potássio, cloro, enxofre, fósforo e sódio (Tabela 1 do Capítulo 3), que podem ser provenientes da raiz de yacon (K e P) ou do antioxidante metabissulfito de sódio com que as raízes foram tratadas antes da trituração para minimizar o escurecimento enzimático (Na e S). Entre esses elementos, o potássio também pode estar relacionado à absorção de água, pois sais de potássio possuem comportamento higroscópico (MORRIS et al., 1994).

A cristalinidade da amostra liofilizada e dos FOS comerciais foi avaliada por difração de raios-X. Ambos difratogramas não apresentaram picos, caracterizando amostras amorfas (KAWAI et al., 2011). Entretanto, a alta higroscopicidade da amostra obtida experimentalmente, que se apresentava como uma massa rígida e contínua no momento da avaliação, pode ter impedido a correta difração dos raios-X. Estes resultados estão em conformidade com o estudo de Kawai et al. (2011), que analisaram duas amostras de inulina de baixa massa molecular, com grau de polimerização (DP) de 7 e 13, que se apresentavam amorfas.

É possível explicar a alta higroscopicidade da amostra liofilizada proveniente do yacon devido à sua estrutura amorfa, pois diversos trabalhos relatam a aglomeração de produtos em estado amorfo expostos a variadas umidades (MESTE et al., 2002; RONKART et al., 2006; OMAR; ROOS, 2007; RONKART et al., 2009). Sabe-se que a sacarose amorfa absorve maior quantidade de água do que a sacarose cristalina, quando exposta a mesma umidade relativa. No estado cristalino, o açúcar apresenta uma menor probabilidade de interagir com as moléculas de água devido à maior organização e rigidez do sólido, enquanto que, no estado amorfo, os grupos funcionais estão mais expostos à umidade, permitindo que esse tipo de interação (CARLOS et al., 2005).



## SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Com base nos resultados obtidos no desenvolvimento deste trabalho, podem ser listadas algumas sugestões para trabalhos futuros:

- a) Utilizar outros antioxidantes para evitar o escurecimento do extrato de yacon;
- b) Avaliar um maior fator de concentração na UF para aumentar o rendimento do processo;
- c) Avaliar membranas de nanofiltração de outros materiais e com massas molares de corte menores, de modo a obter maior diferença entre a retenção de frutooligossacarídeos e de açúcares simples;
- d) Avaliar melhor o efeito da diafiltração na NF, visando à maior pureza dos FOS;
- e) Avaliar a utilização de microrganismos para promover a fermentação dos açúcares simples e aumentar a pureza dos FOS obtidos;
- f) Secar o retido do processo combinado de UF-NF por meio de atomização, para avaliar se o método de secagem influencia na higroscopicidade do pó enriquecido em frutooligossacarídeos;
- g) Avaliar a adição de agentes encapsulantes para diminuir higroscopicidade do pó.

## REFERÊNCIAS

- AGÜERO, M. R.; ANSORENA, S. I.; ROURA, C. E. V. Thermal inactivation of peroxidase during blanching of butternut squash. **Food Science and Technology**, v. 41, p. 401–407, 2008.
- AHMED, J.; RAMASWAMY, H.S.; KHAN, A.R. Effect of water activity on glass transitions of date pastes. **Journal of Food Engineering**, v. 66, n. 2, p. 253-258, 2005.
- BACCHIN, P.; AIMAR, P.; FIELD, R.W. Critical and sustainable fluxes: Theory, experiments and applications. **Journal of Membrane Science**, v. 281, n.1–2, p. 42-69, 2006.
- BALDASSO, C. **Concentração, purificação e fracionamento das proteínas do soro lácteo através da tecnologia de separação por membranas**. 2008. 179f. Dissertação (Mestrado em Engenharia). Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.
- BHANDARI, B. R.; HOWES, T. Implication of glass transition for the drying and stability of dried foods. **Journal of Food Engineering**, v. 40, n. 1–2, p. 71-79, 1999.
- BARROS, S.T.D. **Clarificação dos sucos de acerola e abacaxi por ultrafiltração: modelagem e simulação do fluxo de permeado e determinação dos mecanismos de fouling**. 2002. 258f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.
- BETORET, E.; BETORET, N.; VIDAL, D.; FITO, P. Functional foods development: trends and technologies. **Trends in Food Science & Technology**, v. 22, n. 9, p. 498-508, 2011.
- BOECKNER, L.S.; SCHNEPF, M.I.; TUNGLAND, B.C. Inulin: a review of nutritional and health implications. **Advances in Food and Nutrition Research**, v. 43, n. 1, p.1-63, 2001.
- BRANS, G. et al. Membrane fractionation of milk: state of the art and challenges. **Journal of Membrane Science**, v. 243, p. 263-272, 2004.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução ANVS/MS nº 18/99**. Estabelece as diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedades funcionais e ou de saúde alegadas em rotulagem de alimentos. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=109>. Acesso em: 08 jun 2010.
- BROWN, C.M.; DULLOO, A.G.; YEPURI, G.; MONTANI, J.P. Fructose ingestion acutely elevates blood pressure in healthy young humans. **American Journal of Physiology**, v. 294, n. 3, p. R730-R737, 2008.
- CABELLO, C. Extração e pré-tratamento químico de frutanos de yacon (*Polymnia sonchifolia*). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, p. 202-207. Campinas, 2005.
- CARLOS, L. D. A.; RESENDE, J.V.; CAL-VIDAL, J. Reduction of freeze-dried powder hygroscopicity by inducing crystallization in model fruit sugar solutions. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 8, n. 2, p. 163-173, 2005.

CATALDO, L.F., SILVA, C. A., MENDES, M.F., NOGUEIRA, R.I., FREITAS, S. P. Extração de inulina a partir da raiz de chicória (*Chicorium intybus L.*) usando dióxido de carbono supercrítico. In: VI CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA EM INICIAÇÃO CIENTÍFICA. **Anais...** São Paulo, 2005.

CLADERA-OLIVERA, F.; MARCZAK, L.D.F.; NOREÑA, C.P.Z.; PETTERMANN, A.C. Modeling water adsorption isotherms of pinhão (*Araucaria angustifolia seeds*) flour and thermodynamic analysis of the adsorption process. **Journal of Food Process Engineering**, v. 34, n. 3, p. 826-843, jun. 2011.

CIANCI, F.C. et al. Processamento de suco de caju por membranas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25, n.3, p. 579-583, jul./set. 2005

COZZOLINO, S.; ANGELIS, R.C. **Revista Nutrição em Pauta**, ano XII, n. 65, edição mar./abr. 2004. Disponível em: <[www.nutricaoempauta.com.br/lista\\_artigo.php?cod=8](http://www.nutricaoempauta.com.br/lista_artigo.php?cod=8)>. Acesso em: 20 mai. 2010.

CRUZ, A.G.; FARIA, J.A.F.; VAN DENDER, A.G.F. Packaging system and probiotic dairy foods. **Food Research International**, v. 40, n. 8, p. 951-956, out. 2007.

DAUFIN, G.; ESCUDIER, J.-P.; CARRÈRE, H.; BÉROT, S.; FILLAUDEAU, L.; DECLOUX, M. Recent and emerging applications of membrane processes in the food and dairy industry. **Food and Bioproducts Processing**, v. 79, n. 2, p. 89-102, 2001.

DAVIS, E. Functionality of sugars: physicochemical interactions in foods. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 62, n.1, p. 170S-177S, 1995.

FANTE, L. **Estudo da cinética de branqueamento e de secagem por ar quente e liofilização do alho (*Allium sativum L.*)**. 2011.120f. Dissertação (mestrado) - Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2011.

FENNEMA, O.R. **Química de Alimentos**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 900 p.

FIGUEIRA, G.M.; PARK, K.J.; BROD, F.P.R.; HONORIO, S.L. Evaluation of desorption isotherms, drying rates and inulin concentration of chicory roots (*Cichorium intybus L.*) with and without enzymatic inactivation. **Journal of Food Engineering**, v. 63, n. 3, p. 273-280, 2004.

FIGUEROA-GONZÁLEZ, I.; QUIJANO, G.; RAMÍREZ, G.; CRUZ-GUERRERO, A. Probiotics and prebiotics - perspectives and challenges. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 91, n. 8, p. 1341-1348, jun. 2011

FRANCK, A. Technological functionality of inulin and oligofructose. **British Journal of Nutrition**, v. 87, n. 2, p. 287-291, 2002.

FU, P.; RUIZ, H.; LOZIER, J.; THOMPSON, K.; SPANGENBERG, C. A pilot-study on groundwater natural organics removal by low-pressure membranes. **Desalination**, v. 102, n.1-3, p. 47-56, 1995.

- FUKAI, K.; MIYAZAKI, S.; NANJO, F.; HARA, Y. Distribution of carbohydrates and related enzyme activities in yacon (*Polymnia sonchifolia*). **Soil Science and Plant Nutrition**, v. 39, n. 3, p. 567-571, 1993.
- GIBERTONI, C. F.; NOGUEIRA, A.M.P.; VENTURINI FILHO, W.G. Ultra e microfiltração de suco de yacon (*Polymnia sonchifolia*) para obtenção de xarope rico em frutanos. **Revista Raízes e Amidos Tropicais**, Botucatu, v. 2, p. 68-81, out. 2006.
- GIBSON, G.R., ROBERFROID, M.B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. **The Journal of Nutrition**, v. 125, n. 6, p. 1401-1412, jun. 1995.
- GONZALEZ-TOMÁS, L.; COLL-MARQUÉS, J.; COSTELL, E. Viscoelasticity of inulin–starch-based dairy systems. Influence of inulin average chain length. **Food Hydrocolloids**, v. 22, n. 7, p. 1372-1380, out. 2008.
- GOTO, K.; FUKAI, K.; HIKIDA, J.; NANJO, F.; HARA, Y. Isolation and structural analysis of oligosaccharides from yacon (*Polymnia sonchifolia*). **Bioscience and Biotechnology Biochemistry**, v. 59, n. 12, p. 2346-2347, 1995.
- GOULAS, A.K.; KAPASAKALIDIS, P.G.; SINCLAIR, H.R.; RASTALL, R.A.; GRANDISON, A.S. Purification of oligosaccharides by nanofiltration. **Journal of Membrane Science**, v. 209, n.1, p. 321-335, 2002.
- GRAEFE, S.; HERMANN, M.; MANRIQUE, I.; GOLOMBEK, S.; BUERKER, A. Effects of post-harvest treatments on the carbohydrate composition of yacon roots in the Peruvian Andes. **Field Crops Research**, v. 86, p. 157–165, 2004.
- GRANATO, D.; BRANCO, G.F.; NAZZARO, F.; CRUZ, A.G.; FARIA, J.A.F. Functional foods and nondairy probiotic food development: Trends, concepts, and products. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 9, n. 3, p. 292-302, 2010.
- GRAU, A.; REA, J. Yacon: *Smallanthus sonchifolius*. (Poepp. & Endl.) H. Robinson. In: HERMANN, M.; HELLER, J. (eds.): **Andean roots and tubers: ahipa, arracacha, maca and yacon**. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. 21. Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Gatersleben, Germany / International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy, 1997. Cap. 5, p. 199-242.
- GRIFFIN, I.J.; DAVILA, P.M.; ABRAMS, S.A. Non-digestible oligosaccharides and calcium absorption in girls with adequate calcium intakes. **British Journal of Nutrition**, v. 87, suplemento 2, p. 187-191, maio 2002.
- GUIGOZ, Y.; ROCHAT, F.; PERRUISSEAU-CARRIER, G.; ROCHAT, I.; SCHRIFFIN, E.J. Effects of oligosaccharide on the faecal flora and non-specific immune system in elderly people. **Nutrition Research**, v. 22, n. 1-2, p. 13-25, jan.-fev. 2002.
- GULLÓN, P.; GONZÁLEZ-MUÑOZ, M.J.; PARAJÓ, J.C. Manufacture and prebiotic potential of oligosaccharides derived from industrial solid wastes. **Bioresource Technology**, v. 102, n.10, p. 6112-6119, 2011.

HAMIDI, M.; AZADI, A.; RAFIEI, P. Hydrogel nanoparticles in drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 60, n. 15, p. 1638–1649, dez. 2008.

HASLER, C.M. Functional foods: benefits, concerns and challenges - a position paper from the American Council on Science and Health. **The Journal of Nutrition**, v. 132, n. 12, p. 3772–3781, dez. 2002.

HAULY, M.C.O.; MOSCATTO, J.A. Inulina e Oligofruktoses: uma revisão sobre propriedades funcionais, efeito prebiótico e importância na indústria de alimentos. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológica**, Londrina, v. 23, n. 1, p. 105-118, dez. 2002.

HOEHN, E.; MCKAY, C. J.; MURRAY, E. D. **Production of high fructose syrup from inulin involving ultrafiltration**. USA Patent number 4,421,852. December 20, 1983.

HOLLOWAY, L.; MOYNIHAN, S.; ABRAMS, S.A.; KENT, K.; HSU, A.R.; FRIEDLANDER, A.L. Effect of oligofruktose-enriched inulin on intestinal absorption of calcium and magnesium and bone turnover markers in postmenopausal women. **British Journal of Nutrition**, v. 97, n.2, p. 365-372, fev. 2007.

HUEBNER, J.; WEHLING, R.L.; HUTKINS, R.W. Functional activity of commercial prebiotics. **International Dairy Journal**, v. 17, n.1, p. 770-775, jul. 2007.

HUNTERLAB: **Princípios básicos de medida y percepción de color**. Versión 1.2, 2001. Disponível em: <http://www.hunterlab.com/pdf/color-s.pdf>. Acesso em 15 jan. 2012.

JENKINS, D.J.A.; KENDALL, C.W.C.; VUKSAN, V. Inulin, Oligofruktose and Intestinal Function. **The Journal of Nutrition**, v. 129, n. 7, p. 1431-1433, jul. 1999.

KAWAI, K.; FUKAMI, K.; THANATUKSORN, P.; VIRIYARATTANASAK, C.; KAJIWARA, K. Effects of moisture content, molecular weight, and crystallinity on the glass transition temperature of inulin. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, n. 2, p. 934-939, 2011.

KOLIDA, S.; GIBSON, G.R. Prebiotic Capacity of Inulin-Type Fructans. **The Journal of Nutrition**, v. 137, n. 11, p. 2503-2506, nov. 2007.

KAMADA, T.; NAKAJIMA, M.; NABETANI, H.; IWAMOTO, S. Pilot-scale study of the purification and concentration of non-digestible saccharides from yacon rootstock using membrane technology. **Food Science and Technology Research**, v. 8, n. 2, p. 172-177, 2002a.

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

KAPSAK, W.R.; RAHAVI, E.B.; CHILDS, N.M.; WHITE, C. Functional foods: Consumer attitudes, perceptions, and behaviors in a growing market. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 111, n. 6, p. 804-810, jun. 2011.

- KUHN, R.C.; MAUGERI FILHO, F.; SILVA, V.; PALACIO, L.; HERNANDEZ, A.; PRADANOS, P. Mass transfer and transport during purification of fructooligosaccharides by nanofiltration. **Journal of Membrane Science**, v. 365, n. 1-2, p. 356-365, 2010.
- KUHN, R.C.; PALACIO, L.; PRADANOS, P.; HERNANDEZ, A.; MAUGERI FILHO, F. Selection of membranes for purification of fructooligosaccharides. **Desalination and Water Treatment**, v. 27, n.1-3, p. 18-24, 2011
- LABUZA, T.P. Sorption phenomena in foods. **Food Technology**, v. 22, n. 3, p. 15- 24, 1968.
- LACHMAN, J.; FERNÁNDEZ, E.C.; ORSÁK, M. Yacon [*Smallanthus sonchifolia* (Poepp. et Endl.) H. Robinson]: chemical composition and use – a review. **Plant and Soil Environment**, v. 49, n. 6, p. 283-290, 2003.
- LACHMAN, J.; HAVRLAND, B.; FERNANDEZ, E.C.; DUDJAK, J. Saccharides of yacon [*Smallanthus sonchifolius* (Poepp. et Endl.) H. Robinson] tubers and rhizomes and factors affecting their content. **Plant and Soil Environment**, v. 50, n. 9, p. 383-390, 2004.
- LAGO, C.; BERNSTEIN, A.; BRANDELLI, A.; NOREÑA, C. Characterization of Powdered Yacon (*Smallanthus sonchifolius* ) Juice and Pulp. **Food and Bioprocess Technology**, v. 4, p. 1-9, 2011.
- LANGLANDS, S. J.; HOPKINS, M. J.; COLEMAN, N.; CUMMINGS, J. H. Prebiotic carbohydrates modify the mucosa-associated microflora of the human large bowel. **Gut**, v. 53, n. 11, p. 1610-1616, nov. 2004.
- LOPES, M.S. Análise de minerais no suco de acerola ultrafiltrado e concentrado por osmose inversa. In: VI CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA EM INICIAÇÃO CIENTÍFICA. **Anais...** Campinas, 2005.
- MADRIGAL, L.; SANGRONIS, E. La inulina y derivados como ingredientes claves en alimentos funcionales. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, v. 57, n. 4, p. 387-396, dez. 2007.
- MAIA, M.C.A.; CAL-VIDAL, J. Kinetics of water uptake by citrus juices in powder form. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 29, n. 2, p. 137-141, 1994.
- MALHEIROS, G.C. **Estudo da alteração da cor e degradação da clorofila durante armazenagem de erva-mate tipo chimarrão**. 2007. 104 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, 2007.
- MALISKA, A.M. Microscopia eletrônica de varredura e microanálise. UFSC, Santa Catarina, 2004.
- MANRIQUE, I.; PÁRRAGA, A.; HERMANN, M. **Jarabe de yacón: principios y procesamiento**. Lima, Peru, 2005. 31 p. (Serie: Conservación y uso de la biodiversidad de raíces y tubérculos andinos: Una década de investigación para el desarrollo (1993-2003), n. 8a).

MENNE, E.; GUGGENBUHL, N.; ROBERFROID, M. Fn-type chicory inulin hydrolysate has a prebiotic effects in humans. **The Journal of Nutrition**, v. 130, n. 5, p. 1197-1199, maio 2000.

MESTE, M.L.; CHAMPION, D.; ROUDAUT, G.; BLOND, G.; SIMATOS, D. Glass transition and food technology: a critical appraisal. **Journal of Food Science**, v. 67, n. 7, p. 2444-2458, 2002.

MEYER, D.; BAYARRI, S.; TÁRREGA, A.; COSTELL, E. Inulin as texture modifier in dairy products. **Food Hydrocolloids**, v. 25, n. 8, p. 1881-1890, dez. 2011.

MINOLTA. **Precise color communications**. Color Control from Feeling to Instrumentation. Osaka, Japan: 1994.

MORAES, F.P.; COLLA, L.M. Alimentos funcionais e nutracêuticos: definições, legislação e benefícios à saúde. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 3, n. 2, p. 109-122, 2006.

MORRIS, K.R.; FAKES, M.G.; THAKUR, A.B.; NEWMAN, A.W.; SINGH, A.K.; VENIT, J.J.; SPAGNUOLO, C.J.; SERAJUDDIN, A.T.M. An integrated approach to the selection of optimal salt form for a new drug candidate. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 105, n.3, p. 209-217, 1994.

MURRIETA-PAZOS, I.; GAIANI, C.; GALET, L.; CUQ, B.; DESOBRY, S.; SCHER, J. Comparative study of particle structure evolution during water sorption: Skim and whole milk powders. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 87, n. 1, p. 1-10, 2011.

MURRIETA-PAZOS, I.; GAIANI, C.; GALET, L.; SCHER, J. Composition gradient from surface to core in dairy powders: Agglomeration effect. **Food Hydrocolloids**, v. 26, n. 1, p. 149-158, 2012.

NARAI-KANAYAMA, A.; TOKITA, N.; ASO, K. Dependence of fructooligosaccharide content on activity of fructooligosaccharide-metabolizing enzymes in yacon (*Smallanthus sonchifolius*) tuberous roots during storage. **Journal of Food Science**, v. 72, n. 6, p. 381-387, 2007.

NINESS, K.R. Inulin and oligofructose: what are they? **The Journal of Nutrition**, v. 129, n. 7, p. 1402-1406, jul. 1999.

NOGUEIRA, R. I. **Processo de obtenção de inulina de chicória (*Cichorium intybus*) em pó**. 2002. 155f. Tese (doutorado) - Faculdade de Engenharia Agrícola, Universidade Estadual de Campinas. 2002.

OHYAMA, T.; ITO, O.; YASUYOSHI, S.; IKARASHI, T.; MINAMISAWA, K.; KUBOTA, M.; TSUKINASHI, T.; ASAMI, T. Composition of storage carbohydrate in tuber roots of yacon (*Polymnia sonchifolia*). **Soil Science and Plant Nutrition**, v. 36, n. 1, p. 167-171, 1990.

OJANSIVU, I.; FERREIRA, C.L.; SALMINEN, S. Yacon, a new source of prebiotic oligosaccharides with a history of safe use. **Trends in Food Science & Technology**, v. 22, n. 1, p. 40-46, jan 2011.

OLIVEIRA, M.A.; NISHIMOTO, E.K. Caracterização de quantificação dos carboidratos de reserva das raízes de yacon (*Polymnia sonchifolia*) mantidas sob condições ambientais e refrigeração. **Revista Raízes e Amidos Tropicais**, Botucatu, v.1, p.30-39, out. 2005.

OLIVEIRA, R.A.; PARK, K.J.; CHIORATO, M.; PARK, K.J.B.; NOGUEIRA, R.I. Otimização de extração de inulina de raízes de chicória. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v.6, n.2, p.131-140, 2004.

OLIVEIRA, R. B.; PAULA, D.A.C.; ROCHA, B.A.; FRANCO, J.J.; GOBBO-NETO, L.; UYEMURA, S.A.; SANTOS, W.F.; COSTA, F.B. Renal toxicity caused by oral use of medicinal plants: The yacon example. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, n. 2, p. 434-441, jan. 2011.

OMAR, A.M.E.; ROOS, Y.H. Water sorption and time-dependent crystallization behaviour of freeze-dried lactose-salt mixtures. **LWT - Food Science and Technology**, v. 40, n.3, p. 520-528, 2007.

ONGARATTO, R.S.; VIOTTO, L.V. Clarificação do suco de pitanga (*Eugenia uniflora L.*) e concentração de carotenoides por microfiltração e ultrafiltração. **Brazilian Journal of Food Technology**, VII BMCFB, junho 2009.

ORDOÑEZ, J.A. et al. **Tecnologia de Alimentos: Componentes dos alimentos e processos**. Porto Alegre: Artmed, 2005. 294p.

PADILHA, V.M.; ROLIM, P.M.; SALGADO, S.M.; LIVERA, A.V.S.; OLIVEIRA, M.G. Tempo de secagem e da atividade de óxido-redutases de yacon (*Smallanthus sonchifolius*) sob tratamento químico. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 7, p. 2178-2184, out. 2009.

PANCHEV, I.; DELCHEV, N.; KOVACHEVA, D.; SLAVOV, A. Physicochemical characteristics of inulins obtained from Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus L.*). **European Food Research and Technology**, v. 233, n. 5, p. 889-896, 2011.

PARK, K.J.; BROD, F.P.R.; PARK, T.H.K.B.; PARK, K.J.B.; NOGUEIRA, R.I.; CORNEJO, F.E.P.; CABRAL, L.M.C.; COURI, S.M.V.M. Processo de obtenção de inulina e seus subprodutos a partir de tubérculos. BR n. PI 0301192-5.10 abr. 2003.

PARK, K.J.; PARK, T.H.K.B.; PARK, K.J.B.; NOGUEIRA, R.I.; LEITE, J.T.C. **Processo de obtenção de concentrado de inulina por abaixamento de temperatura e separação física**. BR Patente número PI 0003867-9. 17 ago. 2000.

PASSOS, L.M.P.; PARK, Y.K. Frutooligossacarídeos: implicações na saúde humana e utilização em alimentos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 33, n.2, p. 385-390, 2003.

PEDRESCHI, R.; CAMPOS, D.; NORATTO, G.; CHIRINOS, R.; CISNEROS-ZEVALLOS, L. Andean yacon root (*Smallanthus sonchifolius* Poepp. Endl) fructooligosaccharides as a potential novel source of prebiotics. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 18, p. 5278-5284, 2003.



PINELO, M.; JONSSON, G.; MEYER, A.S. Membrane technology for purification of enzymatically produced oligosaccharides: Molecular and operational features affecting performance. **Separation and Purification Technology**, v. 70, n. 1, p.1-11, Nov. 2009.

RAO, V.A. The prebiotic properties of oligofructose at low intake levels. **Nutrition Research**, v. 21, n. 6, p. 843-848, jun. 2001.

RANINEN, K.; LAPPI, J.; MYKKÄNEN, H.; POUTANEN, K. Dietary fiber type reflects physiological functionality: comparison of grain fiber, inulin, and polydextrose. **Nutrition Reviews**, v. 69, n. 1, p. 9-21, jan. 2011.

RAMASWAMY, H.; MARCOTTE, M. **Food Processing: principles and applications**. Boca Ratón, EUA: CRC Press, 2006. 420p.

RIVERA, D.; MANRIQUE, I. Zumo de Yacón - Ficha Técnica. Centro Internacional de la Papa (CIP). Lima, Peru, 2005. Disponível em: <[www.cipotato.org/artc/cipcrops/fichazumoyacon.pdf](http://www.cipotato.org/artc/cipcrops/fichazumoyacon.pdf)>. Acesso em: 20 mai. 2009.

ROBERFROID, M.B. Concepts in functional foods: the case of inulin and oligofructose. **The Journal of Nutrition**, v. 129, n. 7, p. 1398-1401, jul. 1999.

ROBERFROID, M.B. Introducing inulin-type fructans. **British Journal of Nutrition**, v. 93, n. 1, p.13-25, 2005.

ROBERFROID, M.B. Inulin-Type Fructans: Functional Food Ingredients. **The Journal of Nutrition**, v. 137, n.11, p. 2493-2502, nov. 2007a.

ROBERFROID, M.B. Prebiotics: The Concept Revisited. **The Journal of Nutrition**, v. 137, n. 3, p. 830-837, mar. 2007b.

ROBERFROID, M.B. Prebiotics and probiotics: are they functional foods? **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 71, n. 6, p. 1682S-1687S, jun. 2000.

ROBERFROID, M.B.; DELZENNE, N.M. Dietary fructans. **Annual Review of Nutrition**, v. 18, p. 117-43, 1998.

RODRIGUES, S.L.C.; MOREIRA, R.L.S.; CARDOSO, M.H.; MERÇON, F. Avaliação dos parâmetros de ultrafiltração de suco de banana. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, p. 98-101, dez. 2003.

RONKART, S.; BLECKER, C.; FOUGNIES, C.; VAN HERCK, J.C.; WOUTERS, J.; PAQUOT, M. Determination of physical changes of inulin related to sorption isotherms: An X-ray diffraction, modulated differential scanning calorimetry and environmental scanning electron microscopy study. **Carbohydrate Polymers**, v. 63, n. 2, p. 210-217, 2006.

RONKART, S.; DEROANNE, C.; PAQUOT, M.; FOUGNIES, C.; LAMBRECHTS, J.-C.; BLECKER, C. Characterization of the physical state of spray-dried inulin. **Food Biophysics**, v. 2, n. 2, p. 83-92, 2007.

RONKART, S.N.; PAQUOT, M.; BLECKER, C.S.; FOUGNIES, C.; DORAN, L.; LAMBRECHTS, J.C.; NORBERG, B.; DEROANNE, C. Impact of the crystallinity on the physical properties of inulin during water sorption. **Food Biophysics**, v. 4, n. 1, p. 49-58, 2009.

ROSENBERG, M. Current and future applications for membrane processes in the dairy industry. **Trend in Food Science and Technology**, v. 6, p. 12-19, jan. 1995.

SÁNCHEZ-LOZADA, L.G.; LE, M.P.; SEGAL, M.; JOHNSON, R.J. How safe is fructose for persons with or without diabetes? **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 88, n. 5, p. 1189-1190, nov. 2008.

SANTANA, I.; CARDOSO, M.H. Raiz tuberosa de yacon (*Smallanthus sonchifolius*): potencialidade de cultivo, aspectos tecnológicos e nutricionais. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, n.3, p.898-905, mai-jun 2008.

SAXENA, A.; TRIPATHI, B.P.; KUMAR, M.; SHAHI, V.K. Membrane-based techniques for the separation and purification of proteins: an overview. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 145, p. 1-22, 2009.

SCHER, C.F. **Estudo do branqueamento e da secagem mediante ar quente do yacon (*Smallanthus sonchifolius*)**. 2009. 76 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2009.

SCHOLZ-AHRENS, K.E.; SCHREZENMEIR, J. Inulin and oligofructose and mineral metabolism: the evidence from animal trials. **The Journal of Nutrition**, v. 137, n. 11, p. 2513-2523, nov. 2007.

SEGAL, M.S.; GOLLUB, E.; JOHNSON, R.J. Is the fructose index more relevant with regards to cardiovascular disease than the glycemic index? **European Journal of Nutrition**, v. 46, n. 7, p. 406-417, 2007.

SEMINARIO, J.; VALDERRAMA, M.; MANRIQUE, I. **El yacón: fundamentos para el aprovechamiento de un recurso promisorio**. Centro Internacional de La Papa (CIP), Lima, Peru, 2003. 60p.

SILVA, F.T. et al. Concentração de suco de laranja (*Citrus sinensis*) por osmose inversa. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.18, n.1, jan./abr. 1998.

SIRÓ, I.; KÁPOLNA, E.; KÁPOLNA, B.; LUGASI, A. Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance - a review. **Appetite**, v. 51, n. 3, p. 456-467, nov. 2008.

SLAVIN, J.L. Position of the American Dietetic Association: Health Implications of Dietary Fiber. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 108, n.10, p. 1716-1731, out. 2008.

SOUZA, M.C.C.; LAJOLO, F.M.; MARTINI, L.A.; CORREA, N.B.; DANI, M.A.; MENEZES, E.W. Effect of oligofructose-enriched inulin on bone metabolism in girls with

low calcium intakes. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, n. 1, Curitiba, jan./fev. 2010.

STANHOPE, K.L.; GRIFFEN, S.C.; BAIR, B.R.; SWARBRICK, M.M.; KEIM, N.L.; HAVEL, P.J. Twenty-four-hour endocrine and metabolic profiles following consumption of high-fructose corn syrup-, sucrose-, fructose-, and glucose-sweetened beverages with meals. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 87, n. 5, p. 1194-1203, mai. 2008.

STRINGHETA, P.C.; OLIVEIRA, T.T.; GOMES, R.V.; AMARAL, M.P.H.; CARVALHO, A.F.; VILELA, M.A.P. Políticas de saúde e alegações de propriedades funcionais e de saúde para alimentos no Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, vol. 43, n. 2, abr./jun., 2007.

TÁRREGA, A.; TORRES, J.D.; COSTELL, E. Influence of the chain-length distribution of inulin on the rheology and microstructure of prebiotic dairy desserts. **Journal of Food Engineering**, v. 104, n. 3, p. 356-363, jun. 2011.

TONELI, J. C. L. **Processos de separação física e secagem de inulina obtida a partir de raízes de chicória (*Cichorium intybus* L.)**. 2006. 208 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

TONELI, J. C. L.; MÜRR F. E. X.; MARTINELLI, P.; FABBRO, I. M. D.; PARK, K. J. Optimization of a physical concentration process for inulin. **Journal of Food Engineering**, v. 80, p. 832-838, 2007.

TONELI, J.T.D.C.L.; PARK, K.J.; MURR, F.E.X.; NEGREIROS, A.A. Efeito da umidade sobre a microestrutura da inulina em pó. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n.1, p. 122-131, jan.-mar. 2008.

TUOHY, K.M.; KOLIDA, S.; LUSTENBERGER, A.M.; GIBSON, G.R. The prebiotic effects of biscuits containing partially hydrolysed guar gum and fructooligosaccharides – a human volunteer study. **British Journal of Nutrition**, v. 86, p. 341-348, 2001.

UNIVERSIDADE DE COIMBRA. Portal Laboratórios Virtuais de Processos Químicos, 2007. Disponível em: <[http://labvirtual.eq.uc.pt/siteJoomla/index.php?Itemid=206&id=57&option=com\\_content&task=view](http://labvirtual.eq.uc.pt/siteJoomla/index.php?Itemid=206&id=57&option=com_content&task=view)>. Acesso em: 30 out. 2011.

VAN DER BRUGGEN, B.; MÄNTTÄRI, M.; NYSTRÖM, M. Drawbacks of applying nanofiltration and how to avoid them: A review. **Separation and Purification Technology**, v. 63, n. 2, p. 251-263, out. 2008.

VAN REIS, R.; ZYDNEY, A. Bioprocess membrane technology. **Journal of Membrane Science**, v. 297, p. 16-50, 2007.

VEEREMAN, G. Pediatric applications of inulin and oligofructose. **The Journal of Nutrition**, v. 137, n. 11, p. 2585-2589, nov. 2007.

VERVOORT, L.; VAN DEN MOOTER, G.; AUGUSTIJS, P.; KINGET, R. Inulin hydrogels. I. Dynamic and equilibrium swelling properties. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 172, n. 1-2, p. 127-135, out. 1998.

VERVOORT, L.; VINCKIER, I.; MOLDENAERS, P.; VAN DEN MOOTER, G.; AUGUSTIJS, P.; KINGET, R. Inulin hydrogels as carriers for colonic drug targeting. Rheological characterization of the hydrogel formation and the hydrogel network. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 88, n. 2, p. 209-214, fev. 1999

VILHENA, S.M.C. **Efeitos da exposição ao sol e do armazenamento sobre o conteúdo e a composição dos carboidratos de reserva em raízes tuberosas de yacon.** 1997. 63 f. Dissertação (Mestrado em Horticultura) - Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 1997.

VILLANOVA, J.C.O.; ORÉFICE, R.L.; CUNHA, A.S. Aplicações farmacêuticas de polímeros. **Polímeros**, São Carlos, v. 20, n. 1, p. 51-64, mar. 2010.

WALIGORA-DUPRIET, A.-J.; CAMPEOTTO, F.; NICOLIS, I.; BONET, A.; SOULAINES, P.; DUPONT, C.; BUTEL, M.-J. Effect of oligofructose supplementation on gut microflora and well-being in young children attending a day care centre. **International Journal of Food Microbiology**, v. 113, n. 1, p. 108-113, jan 2007.

WEAVER, C.M. Inulin oligofructose and bone health: experimental approaches and mechanisms. **British Journal of Nutrition**, v. 93, n. 1, p. 99-103, abr. 2005.

WEICKERT, M.O.; PFEIFFER, A.F.H. Metabolic effects of dietary fiber consumption and prevention of diabetes. **The Journal of Nutrition**, v. 138, n. 3, p. 439-442, mar. 2008.

WONG, J.M.W.; JENKINS, D.J.A. Carbohydrate Digestibility and Metabolic Effects. **The Journal of Nutrition**, v. 137, n. 11, p. 2539-2546, nov. 2007.

YACON apresenta resultado positivo na região Norte. Erechim: Emater/RS, 2003. Disponível em: <http://www.emater.tche.br/site/noticias/noticia.php?id=753>. Acesso em: 22 maio 2010.

YAZDANPANA, N.; LANGRISH, T. A. G. Egg-shell like structure in dried milk powders. **Food Research International**, v. 44, n. 1, p. 39-45, 2011.

YAZDANSHENAS, M.; TABATABAEE-NEZHAD, S.A.R.; SOLTANIEH, M.; ROOSTAAZAD, R.; KHOSHFETRAT, A.B. Contribution of fouling and gel polarization during ultrafiltration of raw apple juice at industrial scale. **Desalination**, v. 258, n.1-3, p. 194-200, 2010.

ZIMMERI, J.E., KOKINI, J.L. The effect of moisture content on the crystallinity and glass transition temperature of inulin. **Carbohydrate Polymers**, v. 48, n. 3, p. 299-304, 2002.

ZULETA, A., SAMBUCETTI, E. Inulin determination for food labeling. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 10, p. 4570-4572, 2001.

## **ANEXO A – Protocolo utilizado na limpeza das membranas**

### **1. MEMBRANA DE ULTRAFILTRAÇÃO UF-10 e UF-30**

Um procedimento de limpeza foi utilizado para restituir as características de fluxo e retenção da membrana e prevenir o desenvolvimento de microrganismos no sistema. A limpeza química consistiu em sete etapas, descritas a seguir: enxágüe com água destilada, limpeza alcalina, limpeza ácida e limpeza com cloro. Estas etapas foram realizadas respeitando os limites de pH e temperatura da membrana recomendados pelo fabricante.

#### **Enxágüe do sistema com água destilada**

Após a remoção do concentrado do sistema, água destilada entre 45 a 50°C foi adicionada e circulada, com o objetivo de remover a solução residual do processo de concentração. Este procedimento foi realizado até o momento em que o permeado se apresente visualmente limpo.

#### **Limpeza alcalina**

O sistema foi preenchido com água destilada ajustando-se o pH entre 10 e 10,5 com hidróxido de sódio (NaOH) na temperatura de aproximadamente 50°C; esta solução foi recirculada no sistema sob ausência de pressão manométrica por 15 a 20 minutos.

#### **Enxágüe com água destilada**

Água foi recirculada no sistema por 20 minutos para remoção da solução alcalina, mantendo-se a temperatura de 50 °C e sob ausência de pressão.

#### **Limpeza ácida**

O sistema foi preenchido com água destilada adicionada de ácido cítrico até atingir pH 2. Esta solução foi circulada no sistema por 10 minutos na temperatura de aproximadamente 50°C a uma pressão de aproximadamente 1,0 bar.

**Enxágüe com água destilada**

Água foi recirculada no sistema por 20 minutos para remoção da solução ácida, mantendo-se a temperatura de 50 °C e sob ausência de pressão.

**Limpeza com hipoclorito de sódio**

O sistema foi preenchido com água destilada e hipoclorito de sódio (NaOCl) até obter, no máximo, 200ppm de cloro.

**Enxágüe com água destilada**

Água foi recirculada no sistema por 20 minutos para remoção da solução de hipoclorito de sódio, mantendo-se a temperatura de 50 °C e sob ausência de pressão.

**2. MEMBRANA DE NANOFILTRAÇÃO NF-1**

De maneira semelhante, um procedimento de limpeza foi utilizado para restituir as características de fluxo e retenção da membrana de nanofiltração, conforme descrito a seguir, respeitando os limites de pH e temperatura da membrana recomendados pelo fabricante.

**Enxágüe do sistema com água destilada**

Após a remoção do concentrado do sistema, água destilada entre 45 a 50°C foi adicionada e circulada, com o objetivo de remover a solução residual do processo de concentração. Este procedimento foi realizado até o momento em que o permeado se apresente visualmente limpo.

**Limpeza alcalina**

O sistema foi preenchido com água destilada ajustando-se o pH entre 10 e 10,5 com hidróxido de sódio (NaOH) na temperatura de aproximadamente 50°C; esta solução foi recirculada no sistema sob ausência de pressão manométrica por 15 a 20 minutos.

**Enxágüe com água destilada**

Água foi recirculada no sistema por 20 minutos para remoção da solução alcalina, mantendo-se a temperatura de 50 °C e sob ausência de pressão.