



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ADRIANA APARECIDA BOSSO TOMAL

**PRODUÇÃO DE GALACTOOLIGOSSACARÍDEOS A
PARTIR DE SORO DE LEITE UTILIZANDO β -
GALACTOSIDASE DE *ASPERGILLUS ORYZAE* E
*KLUYVEROMYCES LACTIS***

Londrina
2015

ADRIANA APARECIDA BOSSO TOMAL

**PRODUÇÃO DE GALACTOOLIGOSSACARÍDEOS A PARTIR
DE SORO DE LEITE UTILIZANDO β -GALACTOSIDASE DE
ASPERGILLUS ORYZAE E *KLUYVEROMYCES LACTIS***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, nível doutorado, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciência de Alimentos

Orientador: Prof. Dr. Raúl Jorge Hernan Castro Gómez

Londrina
2015

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Tomal, Adriana Aparecida Bosso.

Produção de galactooligossacarídeos a partir de soro de leite utilizando β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* e *Kluyveromyces lactis* / Adriana Aparecida Bosso Tomal. Londrina, 2015.

116 f. : il.

Orientador: Raúl Jorge Hernan Castro Gómez.

Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, 2015. Inclui bibliografia.

1 . *Aspergillus oryzae* - Teses. 2. galactooligossacarídeos - Teses. 3. *Kluyveromyces lactis* - Teses. 4. soro de leite - Teses. I. Gómez, Raúl Jorge Hernan Castro. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos. III. Título.

ADRIANA APARECIDA BOSSO TOMAL

**PRODUÇÃO DE GALACTOOLIGOSSACARÍDEOS A PARTIR DE
SORO DE LEITE UTILIZANDO β -GALACTOSIDASE DE
ASPERGILLUS ORYZAE E *KLUYVEROMYCES LACTIS***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, nível doutorado, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciência de Alimentos.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Raúl Jorge Hernan Castro
Gómez
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Giselle Aparecida Nobre Costa
Universidade Norte do Paraná – UNOPAR

Profa. Dra. Isabel Craveiro Moreira
Universidade Tecnológica Federal do Paraná -
UTFPR

Prof. Dr. Hélio Hiroshi Suguimoto
Universidade Norte do Paraná - UNOPAR

Profa. Dra. Elza louko Ida
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 18 de dezembro de 2015.

*Ao meu esposo Willian, pelo amor, carinho,
estímulo e por sempre me apoiar em minhas
decisões.*

*Aos meus pais Antonio e Jacira, e minhas
irmãs Andréia e Alessandra pelo amor,
confiança, e carinho incondicional
transmitidos por toda minha vida.*

AGRADECIMENTOS

A Deus por me amparar nos momentos difíceis, me dar força interior para superar as dificuldades, mostrar os caminhos nas horas incertas e me suprir em todas as minhas necessidades.

Ao Prof. Dr. Raúl Jorge Hernan Castro Gómez, pela valiosa orientação, pelos ensinamentos que proporcionaram meu crescimento pessoal e profissional e pela confiança que despertou meu profundo respeito e admiração.

Aos docentes e funcionários do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina pelos ensinamentos e auxílio, em especial às professoras Elza Ioko Ida e Marta de Toledo Benassi, coordenadoras do curso da pós-graduação durante o meu período de doutoramento, que sempre estiveram à disposição para auxiliar em todas as dúvidas e etapas que foram surgindo.

À Capes, pela bolsa de estudo concedida.

À minha irmã Alessandra Bosso, meu profundo e eterno agradecimento, por estar sempre ao meu lado durante estes anos no doutorado, me ajudando de todas as formas possíveis dentro e fora do laboratório para o êxito deste trabalho. Além de me aguentar em todas as horas de desânimo e pessimismo quando parecia que nada iria dar certo depois de tentar, tentar, tentar...

Ao Lucas Caldeirão pela fundamental ajuda na reta final deste trabalho, pela amizade construída neste período e por estar sempre presente e disponível nas horas de maior desespero.

Um agradecimento especial ao Fernando Sanches, pela amizade, disponibilidade e auxílio na utilização do DIONEX.

Aos amigos que conheci durante o doutorado, em especial Marli, Marsívio, Raíssa, Karla, Lucas, Leonardo e Flávia.

Aos demais colegas do Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, em especial: Cintia Handa, Dani Honorato, Maria Rita, Natália Niguma, Paulo de Tarso e Sabrina pela amizade e pelos agradáveis momentos durante o doutoramento.

Ao professor Hélio H. Suguimoto pelas primeiras orientações sobre GOS e por me incentivar na procura do doutorado na área de alimentos. Obrigada por acreditar.

À Universidade Norte do paraná (UNOPAR), na pessoa de Hélio Navarro, pela disponibiliza o de horário para realiza o dos experimentos.

Aos professores do curso de Química da UNOPAR- Ara ngas, em especial Danilo Antonio Giarola e Priscila Bonfim Gonçalves, pelo auxílio dado aos alunos nos meus momentos de ausência.

A todos que direta ou indiretamente auxiliaram no desenvolvimento e conclusão deste trabalho.

“A menos que modifiquemos a nossa maneira de pensar, não seremos capazes de resolver os problemas causados pela forma como nos acostumamos a ver o mundo”.
(Albert Einstein)

TOMAL, Adriana Aparecida Bosso. **Síntese de Galactooligossacarídeos a partir de soro de leite utilizando diferentes fontes de β -galactosidase**. 2015. 116 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2015.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a obtenção de galactooligossacarídeos (GOS) a partir de soro de leite, através da reação enzimática com β -galactosidase comercial de *Aspergillus oryzae* e *Kluyveromyces lactis*. Os carboidratos foram quantificados por cromatografia líquida de alta eficiência de troca iônica acoplado com detector de pulso amperométrico (HPEAC-PAD). Os efeitos da concentração de soro de leite, pH, temperatura e suas interações foram estatisticamente estudadas por meio da metodologia de superfície de resposta utilizando experimento fatorial 2^3 . Para a enzima originada de *A. oryzae*, as melhores condições para a maximização da produção de galactooligossacarídeos totais (GOS_t) foram determinadas pelo ensaio que corresponde a concentração de soro de leite igual a 400 g/L, temperatura de 45 °C e pH de 4.5. Nessas condições, houve o aumento de 137% na formação de GOS_t em relação ao ensaio de menor produção. O máximo rendimento e síntese de GOS_t foi de 12.97% e 28.72 g/L, respectivamente. A máxima produção dentre os tratamentos estudados para a enzima proveniente de *K. lactis* foi observada em um sistema reacional composto por 400 g/L de soro de leite a 40 °C e pH 6.0. Sob estas condições, a produção de GOS_t e rendimento de GOS_t foram, respectivamente, 28.94 g/L e 10.12%. Para esta enzima, a conversão de lactose foi de 91.35% e a formação do trissacarídeo 6'-galactosil-lactose (GOS β -1,6) foi de 9.10% da produção de GOS_t. Estes resultados indicam que a utilização de soro de leite em pó e a enzima β -galactosidase de *K. lactis* é viável para produção de um alimento rico em GOS_t, potencialmente prebiótico, e de baixo teor de lactose. Adicionalmente, foi realizado o estudo cinético da produção de GOS_t a partir das referidas enzimas sobre o soro de leite e comparada com a lactose pura. Para a enzima de *A. oryzae*, não houve diferença significativa na produção de galactooligossacarídeos totais (GOS_t) ($p > 0.05$) quando comparada a ação da enzima sobre o soro de leite ou lactose pura, sendo 21.68 g/L e 21.24 g/L, respectivamente, após 120 minutos de reação. Entretanto, a enzima de *K. lactis* revelou produzir dez vezes mais GOS_t no soro de leite do que na lactose pura, sendo 34.65 g/L e 3.63 g/L, respectivamente, também para 120 minutos. Quanto ao perfil cinético, foi observado que a enzima de *A. oryzae* em soro de leite teve a produção máxima de GOS_t de 26.47 g/L aos 240 minutos de reação, onde 62.5% da lactose inicial é convertida em glicose, galactose e GOS. A β -galactosidase de *K. lactis* produziu, a partir do soro de leite, 34.65 g/L de GOS_t aos 120 minutos de reação e converteu 90.01% da lactose inicial e, aos 240 minutos, a lactose foi completamente transformada em mono e galactooligossacarídeos. Esta última enzima, quando comparado com a lactose pura nas mesmas condições, converteu apenas 20% da lactose e produziu 3.87 g/L de GOS_t.

Palavras-chave: *Aspergillus oryzae*, galactooligossacarídeos, *Kluyveromyces lactis*, soro de leite, β -galactosidase.

TOMAL, Adriana Aparecida Bosso. **Galactooligosaccharide synthesis from whey using different sources of β -galactosidase**. 2015. 116 f. Thesis (Doctor Degree in Food Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2015.

ABSTRACT

The aim of this study was obtain galactooligosaccharides (GOS) using whey as substrate and enzymatic reaction with commercial β -galactosidase from *Aspergillus oryzae* (Pharmanostra 5000 U/g) and *Kluyveromyces lactis* (Maxilact® LX 5000). Carbohydrates were quantified by High Performance Anion Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection (HPEAC-PAD). The effects of whey concentration, pH, temperature and their interactions were statistically investigated by response surface methodology using 2^3 factorial experiment. From *A. oryzae* enzyme, the best conditions to maximize the production of total galactooligosaccharides (GOS_t) were determined by treatment corresponding to whey concentration equal to 400 g/L, temperature of 45 °C and pH 4.5. In these conditions, there was an increase of 137% in GOS_t formation with respect to the lower production assay. The maximum yield and GOS_t synthesis was 12.97% and 28.72 g/L, respectively. The maximum yield among the studied treatments for enzyme from *K. lactis* was determined in a reaction system composed by 400 g/L of whey at 40 °C and pH 6.0. Under these conditions, the GOS_t production and GOS_t yield were, respectively, 28.94 g/L and 10.12%. For this enzyme, the lactose conversion was 91.35% and the synthesis of the trisaccharide 6'-galactosil-lactose (GOS β -1,6) was 9.10% of GOS_t. These results indicate that the use of whey powder and β -galactosidase from *K. lactis* is viable for the production of a food rich in GOS_t, prebiotic potential and low lactose. Additionally, the kinetic study of GOS_t production was performed from the enzymes on whey and compared with pure lactose. For *A. oryzae* enzyme, there was no significant difference in production of total galactooligosaccharides (GOS_t) ($p > 0.05$) when comparing the action of the enzyme on the whey or pure lactose, being 21.68 g/L and 21.24g/L, respectively, after 120 minutes of reaction. However, the enzyme from *K. lactis* revealed produce ten times more GOS_t on whey than in pure lactose, being 34.65 g/L and 3.63 g/L, respectively, also for 120 minutes. As for the kinetic profile, was observed that the enzyme from *A. oryzae* on whey had the highest production of GOS_t (26.47g/L) after 240 minutes of reaction, where 62.5% of the original lactose was converted into glucose, galactose and GOS. The β -galactosidase from *K. lactis*, produced, on whey, 34.65 g/L of GOS_t at 120 minutes after started the reaction and converted 90.01% of initial lactose and, at 240 minutes, lactose was completely transformed in mono and galactooligosaccharides. This last enzyme, when compared to pure lactose as substrate, at the same conditions, converted 20% of the lactose only and produced 3.87 g/L de GOS_t.

Key words: *Aspergillus oryzae*, galactooligosaccharides, *Kluyveromyces lactis*. whey protein, β -galactosidase.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1. Rotas enzimáticas - Hidrólise e transgalactosilação da lactose por β -galactosidase..... 29

CAPÍTULO 2

Figura 1. Composição de carboidratos do soro de leite após a ação da β -galactosidase de *A. oryzae* e conversão de lactose..... 69

Figura 2. Superfície de contorno para concentração de GOS_t e rendimento da produção de GOS (Y), respectivamente, com as funções de T e pH (Cs = 400 g/L) (A e D), T e Cs (pH = 4.5) (B e E) e pH e Cs (T = 45 °C) (C e F)..... 72

CAPÍTULO 3

Figura 1. Superfície de contorno GOS_t e Y, respectivamente, em função da Temperatura e pH (Cs = 400 g/L) (A,D), Temperatura e Cs (pH = 6,0) (B,E) e pH Cs (Temperatura = 40 °C)..... 88

Figura 2. Composição de carboidratos do soro de leite após a ação da β -galactosidase e conversão de lactose..... 90

CAPÍTULO 4

Figura 1. Concentração de glicose, galactose, lactose e GOS_t em função do tempo de reação para β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* (A) e *Kluyveromyces lactis* (B)..... 107

Figura 2. Cromatogramas por HPAEC-PAD da reação do soro de leite com a enzima β -galactosidase de (A) *Aspergillus oryzae* (15U/mL), 400 g/L de soro de leite, 40 °C e pH 4,5 e (B) *Kluyveromyces lactis* (15U/mL), 400 g/L de soro de leite, 45 °C e pH 6,0. Os picos correspondem a: (1) Galactose, (2) Glicose, (5) lactose e (6) 6'-galactosil-lactose..... 108

Figura 3. Comparação do consumo de lactose (A) e produção de galactooligossacarídeos totais (B) da ação de β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* sobre os substratos soro de leite e lactose pura..... 109

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1. Principais estruturas químicas dos GOS formados a partir da lactose pela ação da β -galactosidase..... 30

Tabela 2. Galactooligossacarídeos formados por diferentes fontes de β -galactosidase. Quantificação g/100g de GOS total..... 32

Tabela 3. Condições para formação de GOS a partir de β -galactosidase de leveduras, bactérias e fungos..... 35

Tabela 4. Galactooligossacarídeos comerciais..... 37

Tabela 5. Estudo das propriedades prebióticas em voluntários saudáveis..... 39

CAPÍTULO 2

Tabela 1. Matriz experimental (codificada e decodificada), valores de produção de GOS_t, rendimento da produção de GOS_t (Y), conversão de lactose e concentração de GOS β -1,6..... 65

Tabela 2. Condições da corrida cromatográfica para a separação de açúcares..... 67

CAPÍTULO 3

Tabela 1. Matriz experimental (codificada e decodificada), valores de concentração de GOS_t, rendimento da produção de GOS_t (Y), conversão de lactose e concentração de GOS β -1,6..... 82

Tabela 2. Condições da corrida cromatográfica para a separação de açúcares..... 84

Tabela 3. Composição do soro de leite em pó..... 84

Tabela 4. ANOVA para produção de galactooligossacarídeos totais (GOS_t)..... 85

Tabela 5. ANOVA para o rendimento da produção de galactooligossacarídeos totais (Y)..... 86

CAPÍTULO 4

Tabela 1. Condições da corrida cromatográfica para a separação de açúcares..... 103

Tabela 2: Composição do soro de leite em

pó..... 104

Tabela 3. Comparação da utilização de soro de leite e lactose pura sobre a produção de GOS_t, conversão de lactose, rendimento (Y) e produtividade da síntese de galactooligossacarídeos totais de β-galactosidases de *Aspergillus oryzae* ou *Kluyveromyces lactis*..... 105

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
AOAC	Association oficial analytical chemistis
Cs	Concentração de soro de leite
FDA	Food and Drug Administration
FOSHU	Foods for Specified Health Use
Gal	Galactose
Gal _h	Galactose hidrolisada
Gal _{ht}	Galactose hidrolisada teórica
Gal _{trans}	Galactose transgalactosilada
Glic	Glicose
GOS	Galactooligossacarídeo
GOS _t	Galactooligossacarídeo total
GRAS	Generally Recognized As Safe
HPAEC-PAD	High Performance Anion Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection
ICP	Espectrofotômetro de Emissão Atômica
Lac	Lactose
Lac _i	Lactose inicial
Lac _r	Lactose residual
NDO	Non Digestible Oligosaccharides
p	Nível de significância
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
U/g	Unidade de lactase por grama
U/mL	Unidade de lactase por mililitro
Y	Rendimento

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
2	OBJETIVOS	18
2.1	Objetivo Geral	18
2.2	Objetivos Específicos.....	18
3	REFERÊNCIAS	19
CAPÍTULO 1 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA		22
1.1	Soro de Leite	22
1.2	Lactose	23
1.3	Hidrólise da Lactose	24
1.4	Intolerância à Lactose	25
1.5	Enzima β -Galactosidase.....	26
1.6	Oligossacarídeos	27
1.7	Galactooligossacarídeos.....	29
1.8	Síntese de Galactooligossacarídeos.....	31
1.9	Benefícios à Saúde Atribuídos ao Consumo de Galactooligossacarídeos.....	36
1.10	Referências.....	40
CAPÍTULO 2 – PRODUÇÃO DE GALACTOOLIGOSSACARÍDEOS UTILIZANDO β -GALACTOSIDASE DE <i>ASPERGILLUS ORYZAE</i> EM SORO DE LEITE.....		61
2.1	Introdução	62
2.2	Material e Métodos.....	63
2.2.1	Material	63
2.2.2	Métodos	64
2.2.2.1	Produção de GOS	64
2.2.2.2	Planejamento Fatorial.....	64
2.2.2.3	Métodos Analíticos	65
2.2.2.3.1	Caracterização química do soro.....	65

2.2.2.3.2	Produção de GOS	65
2.2.2.3.3	Quantificação do teor de carboidratos por cromatografia líquida de alta eficiência de troca iônica.....	66
2.3	Resultados e Discussão	67
2.3.1	Produção enzimática de GOS	67
2.3.2	Efeito da temperatura, ph e concentração do soro de leite (CS)	69
2.4	Conclusão.....	72
2.5	Agradecimentos	72
2.6	Referência.....	73

**CAPÍTULO 3 – EFEITO DAS CONDIÇÕES DE OBTENÇÃO ENZIMÁTICA
DE GALACTOOLIGOSSACARÍDEOS POR B-
GALACTOSIDASE DE *KLUYVEROMYCES LACTIS*.....**

3.1	Introdução	79
3.2	Material e Métodos	80
3.2.1	Material	80
3.2.2	Métodos	81
3.2.2.1	Produção de GOS	81
3.2.2.2	Planejamento Fatorial.....	81
3.2.2.3	Métodos Analíticos	82
3.2.2.3.1	Caracterização química do Soro	82
3.2.2.3.2	Produção de GOS	82
3.2.2.3.3	Quantificação do teor de carboidratos por cromatografia líquida de alta eficiência de troca iônica.....	83
3.3	Resultados e Discussão	84
3.3.1	Caracterização do soro de leite	84
3.3.2	Efeito da temperatura, ph e concentração do soro de leite (CS)	85
3.3.3	Síntese enzimática de GOS	90
3.4	Conclusão.....	92
3.5	Agradecimentos	92
3.6	Referências.....	92

CAPÍTULO 4 – PERFIL CINÉTICO DE GALACTOOLIGOSSACARÍDEOS	
PRODUZIDOS POR B-GALACTOSIDASE DE	
<i>ASPERGILLUS ORYZAE E KLUYVEROMYCES LACTIS</i>.....98	
4.1	Introdução99
4.2	Material e Métodos100
4.2.1	Materiais100
4.2.2	Métodos101
4.2.2.1.1	Caracterização química do soro101
4.2.2.2	Formação de galactooligossacarídeos a partir do soro de leite.....101
4.2.2.3	Análise estatística.....102
4.2.2.4	Quantificação dos Carboidratos (HPAEC-PAD)103
4.3	Resultados e Discussão104
4.3.1	Caracterização do soro de leite em pó.....104
4.3.2	Comparação da produção de GOS a partir de soro de leite ou lactose104
4.3.3	Perfil cinético da produção de GOST.....106
4.3.4	Comparação cinética utilizando substratos soro de leite e lactose pura por <i>K. Lactis</i>109
4.4	Conclusão.....110
4.5	Agradecimentos110
4.6	Referências.....111
CONCLUSÃO GERAL.....116	

1. INTRODUÇÃO

O soro de leite é um subproduto da indústria de laticínios, é produzido em grande quantidade e possui uma alta carga poluidora, representando, um problema ambiental significativo (MURARI et al., 2013). O soro representa uma faixa de 85 a 95% do volume do leite e retém 55% de seus nutrientes (GUIMARÃES; TEIXEIRA; DOMINGUES, 2010). Desta forma o soro vem sendo utilizado industrialmente no desenvolvimento de processos viáveis para convertê-lo em ingrediente alimentar de alto valor agregado (ANTUNES, 2003).

Os oligossacarídeos são açúcares encontrados como componentes naturais em alimentos como frutas, vegetais, leite e mel, podem ser sintetizados enzimaticamente por via biotecnológica (JOVANOVIC-MALINOVSKA; KUZMANOVA; WINKELHAUSEN, 2015; DWIVEDI; SAHRAWAT; PUPPALA, 2014; GARCÍA-CAYUELA; DÍEZ-MUNICIO; HERRERO, 2014). Muitos destes oligossacarídeos apresentam efeito prebiótico, proporcionando efeito positivo na composição da microbiota intestinal, sendo resistentes às ações das enzimas salivares e intestinais (RASTALL; GIBSON, 2015; VITETTA et al., 2014).

A enzima β -galactosidase é uma importante enzima utilizada industrialmente na hidrólise da lactose do leite, este dissacarídeo, de baixo poder adoçante, ao ser ingerido por pessoas intolerantes alcança o intestino delgado sem ser afetado e sofre fermentação microbiana no intestino grosso, causando desconforto abdominal, diarreias e outros distúrbios gastrintestinais (GEKAS; LÓPEZ-LEIVA, 1985).

A importância da β -galactosidase vem sendo ressaltada por sua propriedade de gerar derivados de lactose através de transgalactosilação para formar galactooligossacarídeos (GOS) (TZORTZIS; VULEVIC, 2009).

Os galactooligossacarídeos são compostos obtidos industrialmente a partir de substratos que contenham lactose, mediante a transgalactosilação catalisada pela enzima β -galactosidase. Estas enzimas, em determinadas condições, são capazes de catalisar tanto a hidrólise da lactose, como a formação de uma ligação β -glicosídica entre a galactose liberada na hidrólise e a lactose. Os GOS também se encontram de forma natural no leite humano (CORZO et al., 2015).

A composição da mistura de GOS resultante depende da fonte de enzima utilizada, da concentração e natureza do substrato e das condições de reação (pH, temperatura e tempo) (BOON; JANSSEN; RIET, 2000; SPLECHTNA et al., 2006).

Estes carboidratos representam um reconhecido caráter prebiótico que estimulam o crescimento de bactérias lácteas e bifidobactérias no intestino humano (ROBERFROID et al., 2010).

Os GOS possuem propriedades tais como a produção de ácidos graxos benéficos de cadeia curta, aumento da absorção de cálcio e magnésio, além da eliminação de compostos tóxicos (MONTAÑÉS et al., 2009). São resistentes à hidrólise das enzimas digestivas intestinais e possuem efeitos fisiológicos semelhantes ao das fibras dietéticas (MORISHITA et al., 2002).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Estudar a obtenção de galactooligossacarídeos partir do substrato soro de leite, através da reação enzimática com β -galactosidase comercial de *Aspergillus oryzae* (Pharmanostra 5000 U/g) e *Kluyveromyces lactis* (maxilact® LX 5000).

2.2. Objetivos Específicos

- Estudar a produção de galactooligossacarídeos a partir do soro de leite utilizando a enzima comercial β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* e *Kluyveromyces lactis*.
- Determinar as melhores condições de pH, temperatura e concentração de soro de leite na produção de galactooligossacarídeos utilizando a enzima comercial β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* e *Kluyveromyces lactis*.
- Comparar perfil cinético na produção de galactooligossacarídeos a partir da enzima comercial β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* e *Kluyveromyces lactis*.

3. REFERÊNCIAS

ANTUNES, A. J. **Funcionalidades de Proteínas do Soro de Leite Bovino**. São Paulo, Editora Manole, 2003.150p.

BOON, M. A.; JANSSEN, A. E. M.; RIET, K., V. Effect of temperature and enzyme origin on the enzymatic synthesis of oligosaccharides. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, p. 271-281, 2000.

CORZO, N.; ALONSO, J. L.; AZPIROZ, F.; CALVO, M. A.; CIRICI, M.; LEIS, R.; LOMBO, F.; MATEOS-APARICIO, I.; PLOU, F. J.; RUAS-MADIEDO, P.; RUPEREZ, P.; REDONDO-CUENCA, A.; SANZ, M. L.; CLEMENTE, A. Prebióticos; concepto, propiedades y efectos beneficiosos, **Nutrición Hospitalaria**, v. 31, p. 99-118, 2015.

DWIVEDI, S.; SAHRAWAT, K.; PUPPALA, N.; Ortiz, R. Plant prebiotics and human health: Biotechnology to breed prebiotic-rich nutritious food crops. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 17, p. 238–245, 2014.

GARCÍA-CAYUELA, T.; DÍEZ-MUNICIO, M.; HERRERO, M. Selective fermentation of potential prebiotic lactose derived oligosaccharides by probiotic bacteria, **International Dairy Journal**, v. 38, p. 11-15, 2014.

GEKAS, V.; LÓPEZ-LEIVA, M. Hydrolysis of lactose: a literature review. **Process Biochemistry**, v. 20, p. 2-12, 1985.

GUIMARAES, P. M. R.; TEIXEIRA, J. A.; DOMINGUES, L. Fermentation of lactose to bio-ethanol by yeasts as part of integrated solutions for the valorization of cheese whey. **Biotechnology Advances**, v. 28, p. 375-384, 2010.

JOVANOVIC-MALINOVSKA, R.; KUZMANOVA, S.; WINKELHAUSEN, E. Application of ultrasound for enhanced extraction of prebiotic oligosaccharides from selected fruits and vegetables. **Ultrasonics Sonochemistry**, v.22, p.446-453, 2015.

MONTAÑÉS, F.; OLANO, A.; REGLERO, G.; IBAÑÉZ E, FORNARI, T. Supercritical technology as an alternative to fractionate prebiotic galactooligosaccharides. **Separation and Purification Technology**, v. 66, n. 2, p. 383-389, 2009.

MORISHITA, Y.; OOWADA, T.; OZAKI. A.; MIZUTANI, T. Galactooligosaccharide in combination with Bifidobacterium and Bacteroides affects the population of *Clostridium perfringens* in the intestine of gnotobiotic mice. **Nutrition Research**, v.22, p. 1333-41, 2002.

MURARI, C. S.; MORAES, D. C.; BUENO, G. F.; DEL BIANCH V. L. Avaliação da β pela levedura *kluveromyces marxianus* 229. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 68, n. 393, p. 42-50, 2013.

RASTALL, R. A.; GIBSON, G .R. Recent developments in prebiotics to selectively impact beneficial microbes and promote intestinal health. **Current Opinion in Biotechnology**, 32, 42-46, 2015.

ROBERFROID, M.; GIBSON, G. R.; HOYLES, L.; MCCARTNEY, A. L.; RASTALL, R. A.; ROWLAND, I.; WOLVERS, D.; WATZL, B.; SZAJEWSKA, H.; STAHL, B.; GUARNER, F.; RESPONDEK, F.; WHELAN, K.; COXAM, V.; DAVICCO, M. J.; LEOTOING, L.; WITTRANT, Y.; DELZENNE, N. M.; CANI, P. D.; NEYRINCK, A. M.; MEHEUST, A.; Prebiotics effects: metabolic and health benefits. **British Journal of Nutrition**, v. 104, p.1-63, 2010.

SPLECHTNA, B.; NGUYEN, T. H.; STEINBOCK, M.; KULBE, K. D.; LORENZ, W.; HALTRICH, D. Production of prebiotic galacto-oligosaccharides from lactose using -galactosidases from *Lactobacillus reuteri*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 4999-5006, 2006.

TZORTZIS, G.; VULEVIC, J.; **Galactooligosaccharide prebiotics**, In: *Prebiotics and Probiotics: Science and Technology*. Ed. D. Charalampopoulos & R.A. Rastall, Springer Science, New York, 2009, p. 207-244.

VITETTA, L.; BRISKEY, D.; ALFORD, H.; HALL, S.; COULSON, S. Probiotics, prebiotics and the gastrointestinal tract in health and disease. **Inflammopharmacol**, v. 22, p. 135–154, 2014.

CAPÍTULO 1 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. Soro de Leite

O soro de leite é um líquido opaco, amarelo-esverdeado, resultante da precipitação de gorduras e caseína do leite durante a fabricação de queijos, que representa em torno de 90% do volume de leite utilizado. O soro retém aproximadamente de 50 a 55% dos nutrientes do leite, ou seja, 6,3 - 12,4% dos lipídeos, 21,4 - 25,1% dos compostos nitrogenados, 88,0 - 99,3% dos açúcares e 61,8 - 88,5% dos sais (GONZALÉZ, 2005; HARAGUCHI et al., 2009; OLIVEIRA, 2006).

A composição do soro de leite produzido industrialmente depende do tipo de queijo fabricado e da tecnologia de processamento empregada na produção, o que leva a uma variação no teor de proteínas, gordura e minerais (OLIVEIRA; BRAVO; TONIAL, 2012). De acordo com o procedimento utilizado é possível obter dois tipos de soro diferentes: o soro doce e o soro ácido: O soro doce é obtido da coagulação do leite por ação enzimática e o soro ácido é proveniente da coagulação ácida (CASTRO, 2007; ZACARCHENCO et al., 2008;). A produção do soro doce é resultado da fabricação de queijos duros, semiduros ou macios, como por exemplo, muçarela, prato, minas frescal e provolone, que são os mais comercializados no Brasil (ZACARCHENCO et al., 2008). Já o soro ácido, é originário da manufatura de queijos de consumo mais reduzido como ricota e requeijão (CARVALHO et al., 2007). Os dois tipos de soro apresentam diferenças em relação a acidez e também no conteúdo mineral, e isso confere diferentes propriedades físico-químicas (KOSSEVA et al., 2009). O soro doce possui pH entre 5,9 e 6,6, enquanto o pH do soro ácido varia entre 4,3 e 4,6 (BALDASSO, 2008; ZACARCHENCO et al., 2008).

O soro doce contém maior quantidade de peptídeos e aminoácidos livres (TULLIO, 2007) sendo mais rico em lactose, por outro lado o soro ácido possui em sua composição mais cálcio e fósforo devido à solubilização do complexo cálcio-fósforo existente nas micelas de caseína, em pH ácido (BALDASSO, 2008).

A indústria de laticínios já considerou o soro de leite uma matéria prima de aproveitamento oneroso, entretanto com as regulamentações ambientais que proíbem o descarte de produtos com elevada demanda biológica de oxigênio, com as comprovações científicas do valor nutricional de seus constituintes e com o

desenvolvimento de técnicas de fracionamento, o soro vem sendo utilizado como ingrediente ou como precursor de ingredientes na indústria de alimentos (GERNIGON; SCHUCK; JEANTE, 2010; HATZINIKOLAOU et al., 2005).

Na alimentação, o soro pode ser utilizado na forma líquida, concentrada ou em pó. O soro líquido pasteurizado fresco é pouco utilizado nas indústrias de alimentos devido ao elevado custo de transporte e a suscetibilidade de deterioração durante o armazenamento. As alternativas para a utilização do soro de leite líquido são a fabricação de ricota e a fabricação de bebidas lácteas (BALDASSO; BARROS; TESSARO, 2011).

Já o soro em pó, obtido pela remoção de aproximadamente 95% de umidade é a forma mais satisfatória para o uso em alimentos. Desta forma o soro pode ser armazenado por maior tempo sem alteração das propriedades nutricionais (BALDASSO; BARROS; TESSARO, 2011).

A lactose e as proteínas solúveis são os componentes mais importantes presentes no soro. O dissacarídeo de baixo poder adoçante é uma fonte energética para diversos processos biotecnológicos, além de ser um produto utilizado na indústria farmacêutica e alimentícia (DIAS, 2008).

A produção dos oligossacarídeos a partir de lactose existente no soro tem atraído a atenção de pesquisadores e da indústria de alimentos, devido ao potencial dos oligossacarídeos serem utilizados como ingredientes em alimentos funcionais (RUSTOM; FODA; LÓPEZ LEIVA 1998).

1.2. Lactose

A lactose é o carboidrato característico do leite, responsável por seu sabor levemente adocicado (BOBBIO; BOBBIO, 2003).

A lactose é um dissacarídeo redutor constituído por um radical D-glicose e outro D-galactose, unidos por uma ligação glicosídica β -1,4 (CAMPBELL, 2000; SANTOS, 2011). A lactose pode se apresentar em duas formas e propriedades distintas: α hidratada e β anidra. A forma estrutural da α -lactose pode ser convertida para β -lactose por meio da mutarrotação, ou seja, mudança na posição da hidroxila e do hidrogênio no grupo redutor (PEREIRA et al., 2012). No estado de equilíbrio, a

25 °C, a solução de lactose possui 62,25% na forma beta e 37,75% na forma alfa (PERRONE, 2010).

A lactose é solúvel em água, mas é dez vezes menos solúvel que a sacarose (VALSECHI, 2001). Possui sabor levemente adocicado em comparação com os outros açúcares (sacarose, glicose). Reage com as proteínas do leite ou soro, em altas temperaturas (110 – 150 °C) e se degrada em prolongados períodos de tempo (10 a 20 min), escurecendo o leite e dando-lhe um sabor cozido (MAHONEY, 1998; TRONCO, 2003).

A lactose possui a tendência de adsorver odores e sabores, além de ser higroscópica, o que causa o endurecimento dos derivados lácteos em pó, por exemplo. Em baixa temperatura a lactose é cristalizada dando uma textura arenosa aos produtos lácteos (HATZINIKOLAOU et al., 2005; NOVALIN; NEUHAUS; KULBE, 2005; SENER, KILIC, OZBEK, 2006).

O leite e o soro de leite possuem a lactose como importante componente na sua composição, esse dissacarídeo vem sendo muito utilizado na indústria alimentícia, entretanto devido a sua baixa solubilidade, poder de cristalização e indigestibilidade por uma grande parcela da população, a lactose frequentemente é hidrolisada antes de ser utilizada (CARMINATTI, 2001).

A redução do teor de lactose no leite e seus derivados são de grande importância nutricional e comercial, pois além de modificar e melhorar suas características, como a diminuição dos riscos de cristalização e aumento do poder adoçante, torna-se digerível aos consumidores intolerantes à lactose (HUSAIN, 2010).

1.3. Hidrólise da Lactose

A hidrólise da lactose forma os monômeros β -D-galactose e α -D-glicose, além de pequena quantidade de oligossacarídeos (LÓPEZ-LEIVA; GUZMAN, 1995).

A lactose pode ser hidrolisada por tratamento ácido (método químico) ou por catálise enzimática (método enzimático) através da β -galactosidase.

- Método químico: utilização de altas temperaturas, que podem variar de 90 °C a 150 °C, e alta acidez (pH próximo de 1,5), podendo ocorrer problemas tecnológicos como a desnaturação das proteínas do leite, alteração da cor e odor inaceitável pelo consumidor (USTOK; TARI; HARSA, 2010).

- Método enzimático: pode ser aplicado no leite ou soro de leite sem tratamentos prévios. Nesse método a hidrólise é catalisada pela enzima β -galactosidase. O uso de enzimas permite condições mais brandas de temperatura e pH não causando alterações nos produtos obtidos preservando suas propriedades (HATZINIKOLAOU et al., 2005, LADERO, SANTOS, GARCÍA-OSHOA, 2000, LONGO, 2006).

A hidrólise enzimática da lactose é um dos mais importantes processos biotecnológicos na indústria de alimentos e seus efeitos são potencialmente benéficos sobre a assimilação dos alimentos que contenham lactose e com vantagens ambientais na aplicação industrial (JURADO et al., 2002). Alguns dos benefícios da hidrólise da lactose são: melhoria das características tecnológicas e sensoriais de alimentos, formação de monossacarídeos; formação de galactooligossacarídeos favorecendo o crescimento da microbiota intestinal benéfica; maior biodegradabilidade do soro de leite, obtenção de leite com baixo teor de lactose, tornando-o mais digerível para pessoas com problemas relacionados a intolerância à lactose (LONGO, 2006; MAHONEY, 1998).

1.4. Intolerância à Lactose

A intolerância à lactose ocorre quando o indivíduo é incapaz de produzir ou produz com deficiência a enzima β -galactosidase, necessária para hidrolisar a lactose em glicose e galactose, e posterior metabolização pelo organismo (MATTAR; MAZO, 2010; OBINU et al., 2010). Como resultado, a falta da enzima faz a lactose ingerida fermentar no intestino, ocasionando condições desagradáveis, tais como flatulência, distensão abdominal e diarreia (ADHIKARI et al., 2010; BARBOSA; ANDREAZZI, 2011; LOMER; PARKES; SANDERSON, 2008).

A intolerância é um problema que atinge 75% da população mundial. (BACELAR JÚNIOR; KASHIWABARA; NAKAOKA, 2013).

A razão mais comum para a má digestão da lactose e o declínio da atividade da enzima β -galactosidase com o aumento da idade (CUNHA et al., 2007; PAIGE, 2013; SWALLOW, 2003). Segundo Longo (2006) e Oliveira (2005) a intolerância à lactose é uma das mais comuns desordens genéticas.

Como consequência, percebe-se um crescimento considerável na pesquisa e desenvolvimento de processos biotecnológicos, economicamente viáveis para a

obtenção de produtos lácteos com baixo teor de lactose (LADERO, SANTOS, GARCÍA-OSHOA, 2000; RODRIGUEZ; CRAVERO; ALONSO, 2008).

1.5. Enzima β -Galactosidase

A enzima β -galactosidase [β -D-galactoside galactohidrolase; EC 3.2.1.23] também chamada de lactase pertence ao grupo das enzimas conversoras de sacarídeos da família das hidrolases, responsável pela hidrólise do resíduo terminal β -galactopiranosil da lactose (Gal β 1 \rightarrow 4Glic) dando origem a uma mistura equimolecular de glicose e galactose (GROSOVÁ; ROSENBERG; REBROS, 2008; PARK; OH, 2010).

As lactases podem ser encontradas na natureza, distribuídas em vegetais, tais como amêndoas, pêssego, damasco e maçã, em órgãos de animais como intestino, cérebro, testículos, placenta e ainda é produzida por uma vasta gama de micro-organismos (DWEVEDI; KAYASTHA, 2009; MAHONEY, 1998). A fonte microbiana preferida desta enzima para aplicações biotecnológicas são os fungos filamentosos (SANTOS; SIMIQUELI; PASTORE, 2009; ZHENG et al., 2006) e as leveduras (PETROVA; KUJUMDZIEVA, 2010; SANTIAGO et al., 2004), sendo que suas características variam de acordo com sua origem (LADERO, SANTOS, GARCÍA-OSHOA, 2000).

A legislação brasileira especifica por meio da resolução RDC nº 205/2006 complementada pela resolução RDC nº 26, de 26/05/2009, que a enzima β -galactosidase utilizada na indústria de alimentos pode ser de origem microbiana, proveniente dos seguintes micro-organismos: *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Candida pseudotropicalis*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces fragilis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Saccharomyces sp* (BRASIL, 2006). Estas espécies de micro-organismos são classificadas como (GRAS) pela Food and Drug Administration (FDA).

As β -galactosidases constituem uma grande família de proteínas que são conhecidas por catalisar reações hidrolíticas e de transgalactosilação. A atividade hidrolítica é aplicada na indústria alimentar para reduzir o teor de lactose no leite e derivados e a atividade de transgalactosilação tem sido utilizada para sintetizar galactooligossacarídeos (OLIVEIRA, 2007).

As condições ótimas do processo, seja de hidrólise ou de síntese, variam de acordo com o micro-organismo em que a lactase foi extraída (MACFARLANE; STEED; MACFARLANE, 2008; MEDEIROS et al., 2008). As enzimas β -galactosidases diferem de acordo com a fonte. As enzimas obtidas de fungos filamentosos possuem pH ótimo de atuação numa faixa ácida (2,5-4,5) enquanto o pH ótimo de atuação de β -galactosidases provenientes de leveduras e bactérias está numa região mais neutra (6,0-7,0 e 6,5-7,5, respectivamente). Estas diferentes condições de pH ótimo permitem selecionar a β -galactosidase mais apropriada para uma aplicação específica (PANESAR et al., 2006).

Existem duas formas de utilização de β -galactosidase, seja para hidrólise da lactose ou síntese de GOS: na forma solúvel (livre) e imobilizada (HAIDER; HUSAIN, 2009). A opção de imobilização é principalmente induzida pela facilidade de controle da reação e possibilidade de reutilização do sistema, além de aumentar a estabilidade do biocatalisador em questão e permitir o escalonamento industrial (CARVALHO; CANILHA; SILVA, 2006; NERI et al., 2009).

Há um número expressivo de publicações visando a produção de GOS e hidrólise da lactose, contemplando diferentes matrizes e técnicas, tais como: cross-linking (ZHANG et al., 2006), adsorção (GAUR et al., 2006), ligação covalente (FAI et al., 2014; MARÍN-NAVARRO et al., 2014), ligação iônica (PESSELA et al., 2003), encapsulamento (WU et al., 2010) e, até mesmo, a combinação entre esses métodos (ANSARI; HUSAIN, 2010; HAIDER; HUSAIN, 2009).

A indústria apresenta grande interesse na lactase, uma vez que, além da propriedade de produzir GOS, sana problemas associados com o descarte do soro, cristalização da lactose em alimentos congelados. A hidrólise da lactose é uma maneira de possibilitar o consumo de leite e derivados por indivíduos acometidos pela intolerância a esse dissacarídeo (DWEVEDI; KAYASTHA, 2009; GROSOVÁ; ROSENBERG; REBROS, 2008; HUSAIN, 2010).

1.6. Oligossacarídeos

Os oligossacarídeos são definidos como carboidratos que possui entre 02 a 10 monossacarídeos, covalentemente ligados através de ligações glicosídicas (MEHRA; KELLY, 2006).

Vários oligossacarídeos não são digeríveis pelo organismo humano, outros oligossacarídeos são parcialmente hidrolisados no trato gastrointestinal e podem resultar na formação de carboidratos essenciais para a saúde e atuam como substratos e reguladores das principais vias metabólicas (MACFARLANE; STEED; MACFARLANE, 2008). Os monossacarídeos resultantes desta hidrólise parcial são transportados pelo sangue até o fígado e, posteriormente, para a circulação sistêmica (ROBERFROID; SLAVIN, 2000).

Os oligossacarídeos não-digeríveis (NDO - Non Digestible Oligosaccharides) ocorrem naturalmente em muitos alimentos e em tecidos vegetais e podem ser sintetizados no metabolismo de animais e micro-organismos. Os oligossacarídeos são obtidos por extração de tecidos vegetais, por fermentação microbiana, por catalise enzimática ou por reação química (MUSSATO; MANCILHA, 2007). As propriedades fisiológicas e físico-químicas de seus componentes têm sido relatadas como equivalentes as fibras dietéticas, associando sua ação fisiológica com importantes aspectos da saúde humana (NAKAKUKI, 2002).

São solúveis em água, levemente doces e apresentam 0,3 a 0,6 vezes a doçura da sacarose. Este baixo poder adoçante é dependente da estrutura química e massa molecular dos oligossacarídeos e da concentração de mono e dissacarídeos na mistura (GIESE et al., 2011; OKU; NAKAMURA, 2002).

Comparado com o peso molecular dos mono e dissacarídeos, os oligossacarídeos promovem uma elevação da viscosidade, aumentando o corpo e a sensação do alimento na boca. Também podem ser utilizados para alterar a temperatura de congelamento dos alimentos e controlar o nível de escurecimento devido a reação de Maillard em alimentos processados com o uso do calor. Ainda promovem uma retenção da umidade prevenindo a excessiva secagem e proporcionando uma baixa atividade e água, que é conveniente no controle de contaminação microbiana (CRITTENDER; PLAYNE, 1996).

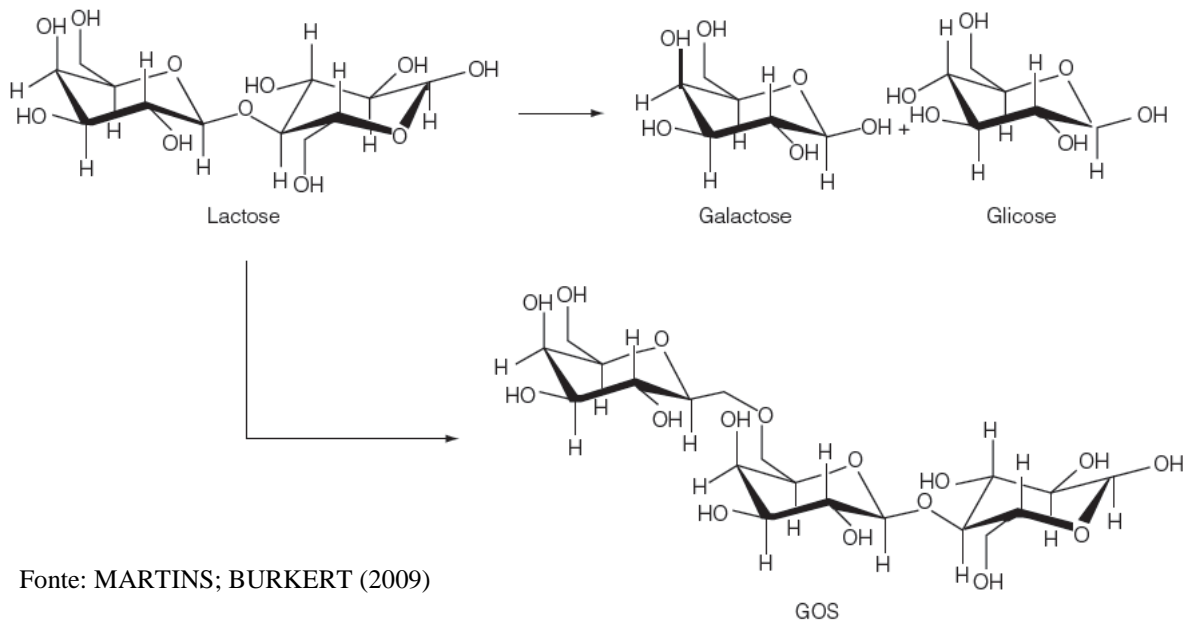
Devido a essas propriedades os oligossacarídeos são considerados uma classe de biomoléculas ativas de grande importância para a saúde e assim estão sendo explorados industrialmente no desenvolvimento de produtos alimentícios funcionais (GIESE et al., 2011). Os oligossacarídeos são extensamente utilizados em alimentos, bebidas, como iogurtes, bebida láctea e em produtos de confeitaria, além de alimentos dietéticos para serem consumidos por diabéticos e como açúcares de baixa cariogenicidade, pois ao contrário do amido e dos

monossacarídeos, os oligossacarídeos não são utilizados pela microflora bucal para formar ácidos e poliglucanas (TUNGLAND; MEYER, 2002).

1.7. Galactooligossacarídeos

Os Galactooligossacarídeos são oligossacarídeos sintetizados a partir de soluções concentradas de lactose por atividade de transgalactosilação da enzima β -galactosidase (CRITTENDER; PLAYNE, 1996). A enzima β -galactosidase possui afinidade similar tanto para hidrolisar a lactose quanto para transgalactosilar (JURADO et al., 2002). A Figura 1 apresenta as duas rotas de conversão de lactose a partir da enzima β -galactosidase.

Figura 1. Rotas enzimáticas - Hidrólise e transgalactosilação da lactose por β -galactosidase



Os GOS são formados por moléculas de galactose ligadas à glicose, $(Gal)_n-Glic$, onde n indica o grau de polimerização (MUSSATTO; MANCILHA, 2007). A mistura de GOS é formada desde trissacarídeos até decassacarídeos, com ligações Gal ($\beta 1 \rightarrow 3$) Gal ($\beta 1 \rightarrow 4$) Gal ($\beta 1 \rightarrow 6$) (LI et al., 2008; LOMER; PARKES; SANDERSON, 2008). A estrutura dos GOS pode diferir na composição dos

açúcares, regioquímica das ligações glicosídicas e no grau de polimerização, dependendo da origem da enzima utilizada (FAI et al., 2014; INTANON et al., 2014).

Embora possam ser formados produtos transgalactosilados de até decassacarídeos, não é comum serem produzidos GOS com cadeias tão extensas (MUSSATTO; MANCILHA, 2007). De acordo com Mahoney (1998), a baixa efetividade da β -galactosidase em produzir GOS de maior peso molecular é explicada pela competitividade da reação de transgalactosilação com a de hidrólise, uma vez que estes oligossacarídeos são simultaneamente sintetizados e hidrolisados pela ação da β -galactosidase. A Tabela 1 está apresentada as principais estruturas químicas dos GOS.

Tabela 1. Principais estruturas químicas dos GOS formados a partir da lactose pela ação da β -galactosidase

Grau de polimerização	GOS
Dissacarídeos	
β -D-Gal (1 \rightarrow 6)-D-Glic	Alolactose
β -D-Gal (1 \rightarrow 6)-D-Gal	Galactobiose
β -D-Gal (1 \rightarrow 3)-D-Gal	
β -D-Gal (1 \rightarrow 3)-D-Glic	
β -D-Gal (1 \rightarrow 2)-D-Glic	
Trissacarídeos	
β -D-Gal (1 \rightarrow 6)-D-Gal (1 \rightarrow 6)-D-Glic	6' dilactosil-glicose
β -D-Gal (1 \rightarrow 6)-D-Gal (1 \rightarrow 4)-D-Glic	6' galactosil-glicose
β -D-Gal (1 \rightarrow 6)-D-Gal (1 \rightarrow 6)-D-Gal	6' galactotriose
β -D-Gal (1 \rightarrow 3)-D-Gal (1 \rightarrow 4)-D-Glic	3' galactosil-glicose
β -D-Gal (1 \rightarrow 4)-D-Gal (1 \rightarrow 4)-D-Glic	4' galactosil-glicose
Tetrassacarídeos	
β -D-Gal (1 \rightarrow 6)-D-Gal (1 \rightarrow 6)-D-Gal (1 \rightarrow 4)-D-Glic	6' digalactosil-lactose
β -D-Gal (1 \rightarrow 6)-D-Gal (1 \rightarrow 3)-D-Gal (1 \rightarrow 4)-D-Glic	
β -D-Gal (1 \rightarrow 3)-D-Gal (1 \rightarrow 6)-D-Gal (1 \rightarrow 4)-D-Glic	
Pentassacarídeos	
β -D-Gal (1 \rightarrow 6)-D-Gal (1 \rightarrow 6)-D-Gal (1 \rightarrow 6)-D-Gal (1 \rightarrow 4)-D-Glic	6' trigalactosil-lactose

Gal, galactose; Glic, glucose

Fonte: MAHONEY (1998)

Um grande número de pesquisas sobre a produção e aplicação de galactooligossacarídeos tem surgido devido às suas propriedades fisiológicas e tecnológicas. Os GOS podem ser utilizados na indústria de alimentos, bebidas, adoçantes, formulação de leite em pó infantil, em ração animal como inibidor de salmonela, além da aplicação medicinal (cosméticos, produtos farmacêuticos e

produtos para diabéticos) (LIMA, 2010). Entretanto, o principal interesse na produção de GOS se encontra nas propriedades fisiológicas, particularmente no estímulo da produção de bifidobactérias no intestino (BRUNO-BARCENA; AZCARATE-PERIL, 2015; MARTINS; BURKERT, 2009; SAKO; MATSUMOTO; TANAKA, 1999; SCHWAB; GANZLE, 2011).

1.8. Síntese de Galactooligossacarídeos

A síntese de GOS envolve três etapas principais: primeiramente há a formação do complexo enzima-galactosil, seguida pela hidrólise da ligação glicosídica $\beta 1 \rightarrow 4$ da lactose e a liberação simultânea da glicose. Então, complexo enzima-galactosil é transferido a aceptores nucleofílicos contendo um grupo hidroxil (água ou sacarídeos). Em soluções com baixa concentração de lactose, este acceptor é a água, resultando na formação de galactose. Em soluções concentradas de lactose, o dissacarídeo atua como acceptor e se liga ao complexo enzima-galactosil resultando na formação de galactooligossacarídeos (MAHONEY, 1998; RUSTOM; FODA; LÓPEZ-LEIVA, 1998).

Compreender os fatores que influenciam a produção e estrutura dos GOS pode contribuir no processo de produção dos mesmos com propriedades relevantes para a sua utilização em aplicações alimentares, além da obtenção de maior rendimento na produção de GOS (PRENOSIL; STUKER; BOURNE, 1987).

De acordo com López-Leiva e Guzman (1995), a fonte da enzima, o tempo de reação, a temperatura e o pH do processo, a concentração inicial de lactose e a presença de inibidores ou ativadores específicos para a enzima, têm influência sobre a quantidade de GOS formada.

A afinidade de hidrólise da β -galactosidase também influencia no rendimento de GOS, pois os monossacarídeos glicose e, principalmente, galactose são reconhecidos como inibidores da reação de transgalactosilação. A inibição da galactose parece ser resultado de uma competição com a lactose pelo sítio ativo da β -galactosidase, uma vez que esta enzima pode formar o complexo enzima-galactosil. O mecanismo de inibição pela glicose é mais complexo e, dependendo da fonte da enzima, pode ser competitivo ou não competitivo (GOSLING et al., 2010; PARK; OH, 2010).

A concentração da enzima e o tempo devem ser monitorados uma vez que a reação é cineticamente controlada e ocorre em competição com a hidrólise (RASTALL, 2010). De modo geral, quanto maior a concentração de enzima menor será o tempo necessário para obter o maior rendimento em GOS.

A escolha da enzima utilizada na síntese de GOS tem um importante efeito no rendimento, mas também implica no grau de polimerização e nos tipos de galactooligossacarídeos formados (Tabela 2) (BOON; JANSSEN; RIET, 2000; RABIU et al., 2001).

Tabela 2. Galactooligossacarídeos formados por diferentes fontes de β -galactosidase. Quantificação g/100g de GOS total

GOS	A. <i>aculeatus</i>	K. <i>lactis</i>	A. <i>Oryzae</i>	B. <i>circulans</i>
Dissacarídeo				
β -D-Gal (1 \rightarrow 6)-D-Gal	25,5	11,8	0,2	
β -D-Gal (1 \rightarrow 6)-D-Glic	11,2	23,7	1,1	0,9
Trissacarídeo				
β -D-Gal (1 \rightarrow 6)-D-Gal (1 \rightarrow 4)-D-Glic	34,5	48,0	77,4	1,4
β -D-Gal (1 \rightarrow 4)-D-Gal (1 \rightarrow 4)-D-Glic	6,0	0,5	5,4	53,5
β -D-Gal (1 \rightarrow 3)-D-Gal (1 \rightarrow 4)-D-Glic	6,8	2,0	9,1	
β -D-Gal (1 \rightarrow 4)-D-Gal (1 \rightarrow 3)-D-Glic				3,6
Tetrassacarídeo				
β -D-Gal (1 \rightarrow 6)-D-Gal (1 \rightarrow 6)-D-Gal (1 \rightarrow 4)-D-Glic	3,1	3,6	5,6	
β -D-Gal (1 \rightarrow 4)-D-Gal (1 \rightarrow 4)-D-Gal (1 \rightarrow 4)-D-Glic				25,6
Pentassacarídeo				
β -D-Gal (1 \rightarrow 4)-D-Gal (1 \rightarrow 4)-D-Gal (1 \rightarrow 4)-D-Gal (1 \rightarrow 4)-D-Glic				3,6

Fonte: FRENZEL et al. (2015)

Czermak et al. (2004) obtiveram um rendimento de 40% de GOS a partir de uma solução de lactose a 31% com a enzima Maxilact[®] L2000, em um sistema operando em modo contínuo. Splechtna; Nguyen e Haltrich (2007) obtiveram, em seus experimentos, 36% de rendimento e grau de conversão de lactose de 80% usando β -galactosidase de *Lactobacillus reuteri*, para concentração inicial de lactose de 205 mg/mL.

Hsu; Lee e Chou (2007), usando β -galactosidases de *Bifidobacterium longum* BCRC 157C8, obtiveram 32,5% de rendimento e 59,4% de conversão de lactose utilizando solução de lactose a 40%. Rendimentos superiores, da ordem de 50%,

são relatados para β -galactosidases termoestáveis, como a de *Talaromyces thermophilus* (NAKKHARAT et al., 2006).

A síntese de GOS também pode ser beneficiada em altas temperaturas, uma vez que a lactose possui solubilidade relativamente baixa a 25 °C. Em altas temperaturas é possível utilizar concentrações de lactose elevadas e evitar a cristalização (GOSLING et al., 2010).

Chen; Hsu e Shiang (2002) verificaram que o rendimento total da produção de oligossacarídeos, utilizando a enzima β -galactosidase de *Aspergillus oryzae*, aumentava gradualmente com temperaturas de 35-47°C, mas diminuía quando a temperatura excedia 47°C, justificado por uma possível desnaturação da enzima.

Boon; Janssen e Riet (2000) investigaram o efeito da temperatura e da origem da enzima na síntese de oligossacarídeos. Foram testadas várias temperaturas (20, 30, 40 e 50 °C) e foi usada a β -galactosidase de *Bacillus circulans*, *Aspergillus oryzae*, *Kluyveromyces lactis* e *Kluyveromyces fragilis*. O rendimento de oligossacarídeos foi ligeiramente mais elevado em temperaturas mais altas, sendo considerado uma vantagem adicional a influência da concentração inicial da lactose.

Existem vários estudos que concluem que o rendimento de GOS aumenta com a elevação da temperatura (BOON; JANSSEN; RIET, 2000; HSU, LEE; CHOU, 2007). No entanto, as enzimas individuais apresentam claramente características diferentes na sua resposta à temperatura, e assim também há exemplos de rendimento de GOS constante com temperatura variada (IWASAKI; NAKAJIMA; NAKAO, 1996; PRENOSIL; STUKER; BOURNE, 1987; SPLECHTNA et al., 2006).

O pH ótimo para a ação da β -galactosidase na formação de GOS têm dependência direta com a origem da enzima (BOON; JANSSEN; RIET, 2000). Os sítios ativos das enzimas são compostos de grupos ionizáveis que devem estar na forma iônica própria para manter a conformação do sítio ativo, do contrário a enzima é desnaturada (RODRIGUEZ-NOGALES; DELGADILLO, 2005).

Alguns estudos relataram que o pH ótimo para a síntese de GOS é semelhante ao da hidrólise (HSU; YU; CHOU, 2005; JI; PARK; OH, 2005). Este foi o caso com β -galactosidase a partir de *Sulfolobus solfataricus*, que apresentou um pH ótimo para a síntese de GOS em 6,0, próximo do pH ótimo para a hidrólise que é 6,5 (PARK et al., 2008).

A concentração de GOS obtida pode variar amplamente dependendo das condições reacionais utilizadas. De modo geral, quanto maior a concentração de lactose no

meio maior será o rendimento em GOS, uma vez que, posteriormente à hidrólise, o acceptor final do grupo β -galactosil passa a ser a própria molécula de lactose ao invés da água (GOSLING et al., 2011).

Chockchaisawasdee et al. (2005) realizaram um estudo da síntese de GOS a partir de *Kluyveromyces lactis*, em relação à concentração de lactose e concentração da enzima. Os resultados mostraram que a quantidade de GOS formada depende da concentração da lactose, mas não da concentração da enzima. O melhor desempenho da produção de GOS foi obtido na temperatura de 40 °C e pH 7.

Santos (2006) estudou o efeito da concentração de lactose em três diferentes níveis (10%, 25% e 40%) para a produção de galactooligossacarídeos, a 40 °C e pH 4.5, utilizando β -galactosidase de *Scopulariopsis* sp. Observou que o aumento da concentração de lactose no meio influenciou a produção de GOS, obtendo-se a produção máxima de oligossacarídeos (80,8 mg/mL de 4'- galactosil-lactose) em 12 h de reação com 40% de lactose.

Outros trabalhos de produção de GOS estão apresentados na Tabela 3. Observa-se que existe um grande número de micro-organismos, tanto bactérias, quanto fungos (bolores e leveduras), produtores desta enzima com atividade de transgalactosilação. Estes dados mostram que o rendimento máximo de GOS é influenciado pelas condições utilizadas (Temperatura e pH), concentração inicial de lactose e fonte da enzima. O maior rendimento de GOS observado foi de 55%, obtido na síntese com β -galactosidase de *Bullera singularis* (SHIN, PARK; YANG, 1998).

A formação de GOS pode ocorrer a partir de um substrato rico em lactose, como o leite, o soro de leite e permeado de soro de leite (PESSELA et al., 2003).

Trabalhos como de Lisboa et al. (2012) estudaram a produção de GOS utilizando β -galactosidase de *K. lactis* (Lactozym® 3000L) em 400 g/L de soro de leite à 40 °C atingiram o rendimento de 29.9% em 4 horas de reação.

Tabela 3. Condições para formação de GOS a partir de β -galactosidase de leveduras, bactérias e fungos

Fonte da enzima	T (°C)	pH	Lactose (g/L)	GOS (%)	Referência
Leveduras					
<i>Kluyveromyces lactis</i>	38	-	219	13,0	CURDA et al. (2006)
<i>K. lactis</i>	50	6,5	250	14,0	MARTÍNEZ-VILLALUENGA et al. (2008)
<i>K. lactis</i>	50	6,5	400	21,0	SANZ VALERO (2009)
<i>K. lactis</i>	40	7,0	400	44,0	RODRIGUEZ-COLINAS et al. (2011)
<i>K. lactis</i>	30	7,0	400	41,9	LISBOA et al. (2012)
<i>K. marxianus</i>	40	6,5	200	36,0	SRIVASTAVA, MISHRA E CHAND (2015)
<i>K. marxianus</i>	30	7,0	100	25,1	KIM; LEE; LEE (2001)
<i>Saccharopolyspora rectivirgula</i>	60	6,5	600	44,0	NAKAO et al. (1994)
<i>Sirobasidium magnum</i>	60	5,0	200	36,0	CZERMAK et al. (2004)
Fungos filamentosos					
<i>Aspergillus niger</i>	45	4,5	200	18,9	KIM; LEE; LEE (1990)
<i>A. oryzae</i>	37	4,5	400	25,0	SANZ VALERO (2009)
<i>A. oryzae</i>	55	4,5	200	17,0	GAUR et al. (2006)
<i>A. oryzae</i>	40	4,5	400	26,8	URRUTIA et al. (2013)
<i>Scopulariopsis</i> sp	45	5,5	400	22,6	ALMEIDA; PASTORE (2004)
<i>Talaromyces thermophilus</i>	40	6,5	200	50,0	NAKKHARAT; HALTRICH (2007)
Bactérias					
<i>Bacillus circulans</i>	40	6,0	46	41,0	MOZAFFAR et al. (1984)
<i>Bacillus subtilis</i>	10	7,0	200	18,0	RAHIM e LEE (1991)
<i>Bullera singularis</i>	50	5,0	180	50,0	CHO; SHIN; BUCKE (2003)
<i>Bullera singularis</i>	45	4,8	100	55,0	SHIN, PARK; YANG (1998)
<i>B.bifidum</i>	40	6,8	400	43,0	GOULAS et al. (2007)
<i>B. longum</i>	45	6,8	400	32,5	HSU; LEE; CHOU (2007), (2007)
<i>Escherichia coli</i>	37	6,7	220	29,7	CHEN; OU-YANG; YEH (2003)
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	30	6,5	205	39,0	NGUYEN et al. (2007)
<i>L. reuteri</i>	37	6,5	205	38,0	SPLECHTNA et al. (2006)
<i>L. pentosus</i>	50	7,0	100	13,9	HEMMARATCHIRAKUL et al. (2015)
<i>Pyrococcus furiosus</i>	70	5,5	270	33,0	PETZELBAUER et al. (2000)
<i>Sulfolobus solfataricus</i>	80	6,0	600	52,5	PARK et al. (2008)
<i>Thermotoga maritima</i>	80	6,0	500	19,0	JI; PARK; OH (2005)

Frenzel et al., (2015) estudaram a produção de GOS a partir de β -galactosidase de *B. circulans*, *A. oryzae*, *A. aculeatus* e *K. lactis* e obtiveram respectivamente, 41%, 21%, 13% e 11% de rendimento de GOS, indicando que nas

mesmas condições experimentais o rendimento de GOS é influenciado pela fonte da enzima β -galactosidase.

A atividade de transgalactosilação da enzima β -galactosidase pode ser influenciada pelas concentrações e proporções de sais presentes nos substratos citados acima, atuando como ativadores ou inibidores enzimáticos dependendo da especificidade da enzima (MADANI, ZARIF-FARD e GOLCHIN-FAR, 1999).

Fischer e Kleinschmidt (2015) em estudo da produção de GOS em soro de leite avaliaram a influência dos cátions Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , NH_4^+ e K^+ (utilizando 1, 10 e 100 mM de cloretos dos respectivos cátions) na atividade enzimática de β -galactosidase de *A. oryzae* e *K. lactis*. Os resultados mostraram que os cátions, nas diferentes concentrações, não tiveram efeitos sobre a atividade da enzima de *A. oryzae*. Já para a enzima de *K. lactis* a atividade enzimática se apresentou dependente frente a alguns cátions e suas concentrações, sendo moderadamente ativada pela presença de Mg^{2+} e fortemente ativada na presença dos cátions Na^+ , NH_4^+ e K^+ .

1.9. Benefícios à Saúde Atribuídos ao Consumo de Galactooligosacarídeos

Os GOS estão incluídos entre os oligossacarídeos não digeríveis (NDO) que possuem propriedades prebióticas e estão licenciados como aditivos de alimentos FOSHU (Foods for Specified Health Use) pelo Ministério da Saúde do Japão e são preconizados como GRAS (Generally Recognized As Safe) pelo FDA, também são reconhecidos em todos os países da União Europeia como ingredientes alimentares e como aditivos devido a sua presença de forma natural no leite materno (TZORTZIS; VULEVIC, 2009).

Os prebióticos são componentes alimentares não digeríveis que atuam seletivamente na proliferação ou atividade de populações de bactérias desejáveis no cólon (CORZO et al., 2015; MACFARLANE; STEED; MACFARLANE, 2008).

Neste sentido, os critérios para se definir um prebiótico são: resistência à digestão no intestino delgado, hidrólise e fermentação pelas bactérias desejáveis no cólon e estimulação seletiva do crescimento desta mesma microflora, ou efeito bifidogênico (BARRETEAU; DELATTRE; MICHAUD, 2006; PÉRIS; GIMENO, 2008).

Diante o aumento do interesse em uma alimentação saudável, as indústrias de aditivos alimentares mostraram-se interessados em desenvolver produtos que contenham GOS utilizando várias fontes enzimáticas (Tabela 4) (RODRIGUEZ-COLINAS et al., 2012).

Tabela 4. Galactooligossacarídeos comerciais

Produto Comercial	Empresas	Fonte de β -galactosidases	Referências
Bimuno	Clasado Ltd Milton Keynes, UK	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	LAMSAL (2012)
Cup-oligo H-70 Cup-oligo	Nissin Sugar Manufacturing Compny Tokio Japão	<i>Cryptococcus laurentii</i>	TORRES et al. (2010)
Oligomate 50	Yakult Honsha (Tokio, Japão)	<i>A. oryzae</i> e <i>Streptococcus thermophiles</i>	ITO et al. (1990)
Oligomate 55 e 55P TOS-100	Yakult Honsha (Tokio, Japão)	<i>Sporobolomyc singularis</i> e <i>K. lactis</i>	SANGWAN et al. (2011)
Promovita GOS	Fayrefield Food, Crece, UK	<i>A. oryzae</i>	LAMSAL (2012)
Purimune	GTC Nutrition (USA)	<i>Bacillus circulans</i>	SANGWAN et al. (2011)
Vivinal-GOS; TOS syrup	Borcuro Ingredients (Zwolle, Netherlands) Domo The	<i>Bacillus circulans</i>	OTIENO (2010)

Fonte: CORZO et al. (2015)

Dentre os efeitos benéficos dos GOS citados na literatura estão: modificação significativa na microbiota colonizadora do cólon; estímulo à produção de nutrientes; decréscimo no pH do cólon e maior produção dos ácidos graxos de cadeia curta; incremento na excreção fecal de massa seca; aumento na umidade do bolo fecal através de pressão osmótica; inibição da diarreia; efeito protetor contra infecções nos tratos gastrintestinal, respiratório e urogenital; aumento na capacidade de absorção de diferentes minerais, efeito benéfico no metabolismo de carboidratos e de lipídios e redução do risco de câncer de cólon (BARRETEAU; DELATTRE; MICHAUD, 2006; CHONG, 2014; MONTILLA et al., 2015; MUSSATTO; MANCILHA, 2007; NERI et al., 2009; PÉRIS; GIMENO, 2008; TOMAL et al., 2010).

A partir dos GOS comerciais, vários estudos já foram realizados para a verificação do benefício do mesmo à saúde (Tabela 5) (RASTAL, 2010).

Fai e Pastore (2015) relataram que as recentes comprovações científicas estreitando a relação entre dieta e saúde, aliada à maior expectativa de vida e a valorização do consumidor por alimentos saudáveis trouxeram um novo desafio para a indústria de alimentos: o de se adaptar à era da nutrição otimizada.

Tabela 5. Estudo das propriedades prebióticas em voluntários saudáveis

Produto	Estudo	Dose	Resultado	Referências
Oligomate	Cinco adultos saudáveis alimentados com a dose mais baixa durante sete dias, em seguida, a dose mais elevada para 7 dias.	43–143 mg/kg/dia	Aumento de <i>bifidobactérias</i>	TANAKA et al. (1983)
Oligomate	Indivíduos saudáveis com deficiência de bifidobactérias.	36 mg/kg/dia	Aumento significativo de <i>bifidobactérias</i> e <i>lactobacilos</i> ; Diminuição de amônia fecal, indol, e cresol.	ITO et al. (1993)
Oligomate	Oito adultos saudáveis alimentados durante 21 dias em um estudo não controlado.	10 g/dia	Aumento significativo de <i>bifidobactérias</i> .	BOUHNİK et al. (1997)
Vivinal	Quarenta adultos saudáveis alimentados com dietas controladas suplementada com duas doses de GOS por três semanas.	7,5 e 15 g/dia	Não houve diferença significativa.	ALLES et al. (1999)
Vivinal	Trinta voluntários saudáveis alimentados por duas semanas.	8,1 g/dia	Não houve diferença significativa.	ALANDER et al. (2001)
Vivinal	Trinta voluntários saudáveis alimentados por duas semanas.	8,1 g/dia	Não há mudanças no perfil da população de <i>bifidobactérias</i> .	SATOKARI et al. (2001)
BPOligo	Trinta voluntários saudáveis alimentados por quatro semanas.	2,4 g/dia	Aumento significativo de <i>bifidobactérias</i> e <i>lactobacilos</i> .	GOPAL; PRASAD; GILL (2003)
Cup-Oligo	Oito voluntários saudáveis alimentados com uma das doses durante uma semana.	2,5; 5,0; 7.0 ou 10 g/dia	Aumento significativo de <i>bifidobactérias</i>	BOUHNİK et al. (2004)
Bimuno	Trinta voluntários saudáveis em um estudo duplo-cego cruzado comparando doses de Bimuno com sacarose.	1,9 e 3,6 g/dia	Aumento significativo de <i>bifidobactérias</i> com ambas as doses	DE PRETER et al. (2006)

1.10. Referências

ADHIKARI, K.; DOOLEY, L. M.; CHAMBERS I. V. E.; BHUMIRATANA, N. Sensory characteristics of commercial lactose-free milks manufactured in the United States. **LWT - Food Science and Technology**. v. 43, n. 1, p. 113-118, 2010.

ALANDER, M.; MATTO, J.; KNEIFEL, W.; JOHANSSON, M.; KOGLER, B.; CRITTENDEN, R.; MATTILA-SANDHOLM T.; SAARELA, M. Effect of galactooligosaccharide supplementation on human fecal microflora and on survival an persistence of *Bifidobacterium lactis* Bb12 in the gastrointestinal tract. **International Dairy Journal**, v. 11, p. 817- 825, 2001.

ALLES, M. S.; HARTEMINK, R.; MEYBOOM, S.; HARRYVAN, J. L.; VAN LAERE, K. M. J.; NOGENGAST, F. M. Effect of transgalactooligosaccharides on the composition of the human intestinal microflora and on putative risk markers for colon cancer. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 69, p. 980–991, 1999.

ALMEIDA, M. M.; PASTORE, G, M. Açúcares funcionais: Galactooligossacarídeos. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n. 32, p. 10-14, 2004.

ANSARI, S. A.; HUSAIN, Q. Lactose hydrolysis by β -galactosidase immobilized on concanavalin A-cellulose in batch and continuous mode. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 63, p. 68-74, 2010.

BACELAR JÚNIOR, A. J.; KASHIWABARA, T. G. B.; NAKAOKA, V. Y. E. S. Intolerância a lactose – revisão de literatura. **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research**, v.4, n.4, p. 38- 42, 2013.

BALDASSO, C. 2008. 179 f. **Concentração, purificação e fracionamento das proteínas do soro lácteo através da tecnologia de separação por membranas.**

Dissertação (Mestrado em Engenharia) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2008.

BALDASSO, C.; BARROS, T. C.; TESSARO, I. C.; Concentration and purification of whey proteins by ultrafiltration. **Desalination**, v. 278, p. 381-386, 2011.

BARBOSA, C. R.; ANDREAZZI, M. A. Intolerância à lactose e suas consequência no metabolismo do cálcio. **Revista Saúde e Pesquisa**, v.4, n.1, p. 81-86, 2011.

BARRETEAU, H.; DELATTRE, C.; MICHAUD, P. Production of oligosaccharides as promising new food additive generation. **Food Technology and Biotechnology**, v. 44, n. 3, p. 323-333, 2006.

BOBBIO, P. A.; BOBBIO, F. O. **Introdução a química de alimentos**. 3 ed. São Paulo: Varela, 2003. 238p.

BOON, M. A.; JANSSEN, A. E. M.; RIET, K. V. Effect of temperature and enzyme origin on enzymatic synthesis of oligosaccharides. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, p. 271-281, 2000.

BOUHNİK, Y.; FLOURIE, B.; D'AGAY-ABENSOUR, L.; POCHART, P.; GRAMET, G.; DURAND, M.; RAMBAUD, J. C. Administration of transgalacto-oligosaccharides increases fecal *bifidobacteria* and modifies colonic fermentation metabolism in healthy humans. **The Journal of Nutrition**, v. 127, n. 3, p. 444-448, 1997.

BRASIL. AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Resolução RDC nº 205, de 14 de novembro de 2006. Aprova o Regulamento técnico sobre enzimas e preparações enzimáticas para uso na produção de alimentos destinados ao consumo humano conforme a sua origem, constante do anexo desta Resolução. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 17 nov. 2006. Disponível em:

<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/97817a8045a964aa9d5a9fa9166895f7/Resolucao+RDC+n+205+de+14+de+novembro+de+2006.pdf?MOD=AJPERES>.

Acesso em: 21 abr. 2015.

___Resolução nº 26, de 26 de maio de 2009. Aprova lista de enzimas permitidas para o uso em alimentos destinados ao consumo humano conforme a sua origem, constante do anexo desta Resolução, em substituição ao anexo I da Resolução RDC nº 205 de 14 de novembro de 2009. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 26 maio 2009. Disponível em: <http://www.ivegetal.com.br/Anvisa/Resolu%C3%A7%C3%A3o%20RDC%20N%C2%BA%2026%20de%2026%20de%20maio%20de%202009.htm>. Acesso em: 21 abr. 2015.

BRUNO-BARCENA, J. M.; AZCARATE-PERIL, M. A. Galactooligosaccharides and colorectal cancer: feeding our intestinal probiome. **Journal of Functional Foods**, v, 12, p. 92-108, 2015.

CAMPBELL, M. K. **Bioquímica**. 3ª ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 2000. 751p.

CARMINATTI, C. A. 2001. 79f. **Ensaio de hidrólise enzimática da lactose em reator a membrana utilizando beta-galactosidase de *Kluyveromyces lactis***. Dissertação (mestrado em engenharia química) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2001

CARVALHO, B. M. A.; CARVALHO, L. M.; ALCÂNTRA, L. A. P.; BONOMO, R. C. F. Métodos de detecção de fraude em leite por adição de soro de queijo. **Revista Electrónica de Veterinária**, v. 8, n. 6, p. 1-7, 2007.

CARVALHO, W.; CANILHA, L.; SILVA, S. S. Uso de biocatalisadores imobilizados: uma alternativa para a condução de bioprocessos. **Revista Analytica**, v. 23, p. 60-70, 2006.

CASTRO, F.P. de. **Efeito de Diferentes Proporções de Soro de Queijo e Oligofrutose na Contagem de Bactérias Probióticas, nas Características Físicas, Químicas e Sensoriais de Bebidas Lácteas Fermentadas**. 2007. 126f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Programa de Pós-graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, SC. 2007.

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

CHEN, C. W.; OU-YANG, C. C.; YEH, C. W. Synthesis of galactooligosaccharide and transgalactosylation modeling in reverse micelles. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 33, p. 497–507, 2003.

CHO, Y.J.; SHIN, H.J.; BUCKE, C. Purification and biochemical properties of a galactooligosaccharide producing β -galactosidase from *Bullera singularis*. **Biotechnology Letters**, v. 25, p. 2107–2111, 2003.

CHOCKCHAIWASDEE, S.; ATHANASOPOULOS, V. I.; NIRANJAN, K.; RASTALL, R. A. Synthesis of galacto-oligosaccharide from lactose using β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*: studies on membrane-fitted bioreactors. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 89, n. 4, p. 434–443. 2005.

CHONG, E. S. L. A potential role of probiotics in colorectal cancer prevention: review of possible mechanisms of action. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 30, p. 351–374, 2014.

CORZO, N.; ALONSO, J. L.; AZPIROZ, F.; CALVO, M. A.; CIRICI, M.; LEIS, R.; LOMBO, F.; MATEOS-APARICIO, I.; PLOU, F. J.; RUAS-MADIEDO, P.; RUPEREZ, P.; REDONDO-CUENCA, A.; SANZ, M. L.; CLEMENTE, A. Prebióticos; Concepto, propiedades y efectos beneficiosos. **Nutrición Hospitalaria**, v. 31, n.1, p. 99-118, 2015.

CRITTENDER, R. G.; PLAYNE, M. J. Production, properties and applications of food-grade oligosaccharides. **Trends in Food Science & Technology**, v.7, n.11, p. 353-361, 1996.

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

CURDA, L.; RUDOLFOVÁ, J.; STETINA, J.; DRYÁK, B. Dried buttermilk containing galactooligosaccharides - process layout and its verification. **Journal of Food Engineering**, v. 77, p. 468–471, 2006.

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

DE PRETER, V.; VANHOUTTE, T.; HUYS, G.; SWINGS, J.; RUTGEERTS, P.; VERBEKE, K. Effect of lactulose and *Saccharomyces boulardii* administration on the colonic urea-nitrogen metabolism and the bifidobacteria concentration in healthy human subjects. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 23, p. 963–74, 2006.

DIAS, M. C. **Utilização de diferentes substratos e culturas lácteas comerciais empregadas na produção de bebidas lácteas**. 2008. 68f. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2008.

DWEVEDI, A.; KAYASTHA, A.M. Optimal immobilization of β -galactosidase from Pea (PsBGAL) onto Sephadex and chitosan beads using response surface methodology and its applications. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 2667-2675, 2009.

FAI, A. E.C.; SILVA, J. B.; ANDRADE, C. J.; BUTION, M. L.; PASTORE, G. M. Production of prebiotic galactooligosaccharides from lactose by *Pseudozyma tsukubaensis* and *Pichia kluyveri*. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 3, p. 343-350, 2014.

FISCHER, C., KLEINSCHMIDT, T. Synthesis of galactooligosaccharides using sweet and acid whey as a substrate. **International Dairy Journal**, v. 48, p. 15-22, 2015.

FAI, A. E. C.; PASTORE, G. M. Galactooligosacarídeos: produção, benefícios à saúde, aplicação em alimentos e perspectivas. **Scientia Agropecuaria**, v. 6, n. 1, p. 69 – 81, 2015.

FRENZEL, M.; ZERGE, K.; CLAWIN-RADECKER, I.; LORENZEN, P.C. Comparison of the galactooligosaccharide forming activity of different β -galactosidases. **LWT - Food Science and Technology**, v. 60, p.1068-1071, 2015.

GAUR, R.; PANT, H.; JAIN, R.; KHARE, S. K. Galacto-oligosaccharide synthesis by immobilized *Aspergillus oryzae* β -galactosidase. **Food Chemistry**, v. 97, p. 426-430, 2006.

GERNIGON, G.; SCHUCK P.; JEANTET, R. Processing of mozzarella cheese wheys and stretchwaters: a preliminary review. **Dairy Science and Technology**, v. 90, n. 1, p. 27- 46, 2010.

GIESE, E. C.; HIROSI, T.; SILVA, M. L. C.; SILVA, R.; BARBOSA, A. M. Produção, propriedades e aplicações de oligossacarídeos. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 32, n. 2, p. 683-700, 2011.

GONZALÉZ, J. M. D. Elaboración de un queso tipo ricotta a partir de suero lácteo y leche fluida. **Revista Científica**, v. 15, n. 6, p. 543-550, 2005.

GOPAL, P. K.; PRASAD, J.; GILL, H. S. Effects of the consumption of *Bifidobacterium lactis* HN019 (DR10TM) and galacto-oligosaccharides on the microflora of the gastrointestinal tract in human subjects. **Nutrition Research**, v. 23, p.1313–1328, 2003.

GOSLING, A.; STEVENS, G. W.; BARBER, A. R.; KENTISH, S. E.; GRAS, S. L. Recent advances refining galactooligosaccharide production from lactose. **Food Chemistry**, v.121, n. 2, p. 307-318, 2010.

GOSLING, A.; STEVENS, G. W.; BARBER, A. R.; KENTISH, S. E.; GRAS, S. L. Effect of the substrate concentration and water activity on the yield and rate of the transfer reaction of β - galactosidase from *Bacillus circulans*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 3366-3372, 2011.

GOULAS, T. K.; GOULAS, A. K.; TZORTZIS, G.; GIBSON, G. R. Molecular cloning and comparative analysis of four beta-galactosidase genes from *Bifidobacterium bifidum* NCIMB41171. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 76, p. 1365–1372, 2007.

GROSOVÁ, Z.; ROSENBERG, M.; REBROS, M. Perspectives and applications of immobilized β -galactosidase in food industry – a review. **Journal Food Sciences**, v. 26, n.1, p. 1-14, 2008.

HAIDER, T., HUSAIN, Q. Immobilization of beta galactosidase from *Aspergillus oryzae* via immune affinity support. **Biochemical Engineering Journal**, v. 43, n. 3, p. 307-314, 2009.

HARAGUCHI, F. K.; PEDROSA, M. L.; DE PAULA, H.; SANTOS, R. C.; SILVA, M. E. Influência das proteínas do soro sobre enzimas hepáticas, perfil lipídico e formação óssea de ratos hipercolesterolêmicos. **Revista de Nutrição**, v. 22, n. 4, p. 517-525, 2009.

HATZINIKOLAOU, D. G.; KATSIFAS, E.; MAMMA, D.; KARAGOUNI, A.; CHRISTAKOPOULOS, P.; KEKOS, D. Modeling of the simultaneous hydrolysis ultrafiltration of whey permeate by a thermostable β -galactosidase from *Aspergillus niger*. **Process Biochemistry**, v. 24, p. 161-172, 2005.

HEMMARATCHIRAKUL, J.; JATURAPIREE, P.; PRUEKSASRI, S.; WICHIENTHOT, S. Production of galactooligosaccharide by β -galactosidase from *Lactobacillus pentosus* var. *plantarum* BFP32. **International Food Research Journal**, v. 22, n. 6, p. 2550-2557, 2015.

HSU, C. A., YU, R. C., CHOU, C. C. Production of β -galactosidase by Bifidobacteria as influenced by various culture conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v. 104, p. 197-206, 2005.

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

HUSAIN, Q. β -galactosidase and their potential applications: a review. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 30, n. 1, p. 41-62, 2010.

INTANON, M.; ARREOLA, S. L.; PHAM, N. H.; KNEIFEL, W.; HALTRICH, D.; NGUYEN, T. H. Nature and biosynthesis of galacto-oligosaccharides related to oligosaccharides in human breast milk. **FEMS Microbiology Letters**, v. 353, p. 89-97, 2014.

ITO, M.; DEGUCHI, Y.; MIYAMORI, A.; MATSUMOTO, K.; KIKUCHI, H.; MATSUMOTO, K.; KOBAYASHI, Y.; YAJIMA, T.; KAN, T. Effects of administration of galactooligosaccharides on the human fecal microflora, stool weight and abdominal sensation. **Microbial Ecology in Health and Disease**, v. 3, p. 285-292, 1990.

ITO, M.; DEGUCHI, Y.; MATSUMOTO, K.; KIMURA, M.; ONODERA, N.; YAJIMA, T. Influence of galactooligosaccharides on the human fecal microflora. **Journal of nutritional science and vitaminology**, v. 39, p. 635–40, 1993.

IWASAKI, K., NAKAJIMA, M., NAKAO, S. Galacto-oligosaccharide production from lactose by an enzymatic batch reaction using beta-galactosidase. **Process Biochemistry**, v. 31, p. 69-76, 1996.

JI, E. S.; PARK, N. H.; OH, D. K. Galacto-oligosaccharide production by a thermostable recombinant β -galactosidase from *Thermotoga maritime*. **World J Microbiol Biotechnol**, v.1, p. 759-64, 2005.

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

KIM, C. R.; LEE, S. R.; LEE, Y. K.; Formation of galactooligosaccharides by the partially purified β -galactosidase from *Aspergillus niger* CAD 1. **Han'guk Ch'uksan Hakhoechi**, v. 32, p. 323-333, 1990.

KIM, J. H.; LEE, D. H.; LEE, J. S. Production of Galactooligosaccharide by β -Galactosidase from *Kluyveromyces maxianus* var *lactis* OE-20. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 6, p. 337- 340. 2001.

KOSSEVA, M. R.; PANESAR, P. S.; KAUR, G.; KENNEDY, J. F. Use of immobilized biocatalysts in the processing of cheese whey. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 45, n. 5, p. 437–447, 2009.

LADERO, M.; SANTOS, A.; GARCÍA-OCHOA, F. Kinetic modeling of lactose hydrolysis by immobilized β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. **Enzyme and Microbial, Technology**, v. 27, p. 583-592, 2000.

LAMSAL, B. P. Production, health aspects and potential food uses of dairy prebiotic galactooligosaccharides. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 92, p. 2020-2028, 2012.

LI, Z.; XIAO, M.; LU, L.; LI, Y. Production of non-monosaccharide and high-purity galactooligosaccharides by immobilized enzyme catalysis and fermentation with immobilized yeast cells. **Process Biochemistry**, v. 43, p. 896-899, 2008.

LIMA, G. C. **Efeito dos oligossacarídeos FOS e GOS na microbiota intestinal e no pH do conteúdo cecal de ratas Wistar em desenvolvimento**. 2010. 51F. Dissertação (mestrado em engenharia de alimentos) – Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. Campinas. 2010.

LISBOA, C. R.; DE SIMONI M. L.; TRINDADE, R. A.; DE ALMEIDA COSTA, F. A.; DE MEDEIROS BURKERT, J. F.; BURKERT, C. A. V. Response surface methodology applied to the enzymatic synthesis of galacto-oligosaccharides from cheese whey. **Food Science and Biotechnology**, v. 21, p. 1519 -1524, 2012.

LOMER, M. C.; PARKES, G. C.; SANDERSON, J. D. Review article: lactose intolerance in clinical practice—myths and realities. **Alimentary Pharmacology e Therapeutics**, v. 27, n. 2, p. 93–103, 2008.

LONGO, G. **Influência da adição de lactase na produção de iogurte**. 2006. 89f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

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

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

MADANI, R.; ZARIF-FARD, M. R.; GOLCHIN-FAR, F. Effect of activators and inhibitors on lactase activities to determine its kinetic model. **Archives of Razi Institute**, v.50. p. 93-98, 1999.

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

MARÍN-NAVARRO, N.; TALENS-PERALES, D.; OUDE-VRIELINK, A.; CAÑADA, F. J.; POLAINA, J. Immobilization of thermostable β -galactosidase on epoxy support and its use for lactose hydrolysis and galactooligosaccharides biosynthesis. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 30, p. 989-998. 2014.

MARTÍNEZ-VILLALUENGA C, CARDELLE-COBAS A, CORZO N, OLANO A. Study of galactooligosaccharide composition in commercial fermented milks. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 21, p. 540-544, 2008.

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

MATTAR, R.; MAZO, D. F.de C. Intolerância à Lactose: mudança de paradigmas com a biologia molecular. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 56, n. 2, p. 230- 236, 2010.

MEDEIROS, F. O; ALVES, F. G; LISBOA, C. R; MARTINS, D. S; BURKERT, C. A. V; KALIL, S. J. Ondas ultrassônicas e pérolas de vidro: um novo método de extração de β -galactosidase para uso em laboratório. **Química Nova**, v. 31, n. 2, p. 336-339. 2008.

MEHRA, R.; KELLY, P. Milk oligosaccharides: structural and technological aspects. **International Dairy Journal**, v. 16, n. 11, p. 1334-1340, 2006.

MONTILLA, A.; MEGÍAS-PÉREZ, R.; OLANO, A.; VILLAMIEL, M. Presence of galactooligosaccharides and furosine in special dairy products designed for elderly people. **Food Chemistry**, v. 172, p. 481-485, 2015.

MOZAFFAR, Z.; NAKANISHI, K.; MATSUNO, R.; KAMIKUBO, T. Purification and properties of β -galactosidases from *Bacillus circulans*. **Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 3053–3061, 1984.

MUSSATO, S. L.; MANCILHA, I. M. Non-digestible oligosaccharide: a review. **Carbohydrate Polymers**, v. 68, p. 587-507, 2007.

NAKAKUKI, T. Present status and future of functional oligosaccharide development in Japan. **Pure and Applied Chemistry**, v. 74, n. 7, p. 1245-1251, 2002.

NAKAO, M.; HARADA, M.; KODAMA, Y.; NAKAYAMA, T.; SHIBANO, Y.; AMACHI, T. Purification and characterization of a thermostable β -galactosidase with high transgalactosylation activity form *Saccharopolyspora rectivirgula*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 40, n. 5, p. 657-663, 1994.

NAKKHARAT, P.; HALTRICH, D. Beta-galactosidase from *Talaromyces thermophilus* immobilized on to Eupergit C for production of galacto-oligosaccharides during lactose hydrolysis in batch and packed-bed reactor. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 23, n. 6, p.759–64, 2007.

NAKKHARAT, P.; KULBE, D. K.; YAMABHAI, M.; HALTRICH, D. Formation of galactooligosaccharides from the moderately thermophilic fungus *Talaromyces thermophilus*. **Biotechnology Journal**, v. 1, p. 633-638, 2006.

NERI, D. F. M.; BALCÃO, V. M.; COSTA, R. S.; ROCHA, I. C. A. P.; FERREIRA, E. M. F. C.; TORRES, D. P. M.; RODRIGUES, L. R. M.; CARVALHO, L. B.; TEIXEIRA, J. A. Galacto-oligosaccharides production during lactose hydrolysis by free *Aspergillus oryzae* β -galactosidase and immobilized on magnetic polysiloxane-polyvinyl alcohol. **Food Chemistry**, v.115, n.1, p. 92-99, 2009.

NGUYEN, T. H.; SPLECHTNA, B.; KRASTEVA, S.; KNEIFEL, W.; KULBE, K. D.; DIVNE, C.; HALTRICH, D. Characterization and molecular cloning of a heterodimeric β -galactosidase from the probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* R22. **FEMS. Microbiology Letters**, v. 269, p. 136–144, 2007.

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

OBINU, D. A.; ENATTAH, N. S.; PEDRONI, A.; PELTONEN, L.; CAVALLI-SFORZA, L. L.; DORE, M. P. Prevalence of lactase persistence and the performance of a non-invasive genetic test in adult Sardinian patients. **e-SPEN, the European e Journal of clinical nutrition and metabolism**, v. 5, p.1-5, 2010.

OKU, T.; NAKAMURA, S. Digestion, absorption, fermentation, and metabolism of functional sugar substitutes and their available energy. **Pure and Applied Chemistry**, v. 74, n. 7, p. 1253-1261, 2002.

OLIVEIRA, C. C. M. de. Produção de β -galactosidase por levedura recombinante - Desenvolvimento de um sistema de produção estável. 2005. 100f. Dissertação (Mestrado em biotecnologia) – Universidade do Minho, Braga. 2005.

OLIVEIRA, E. A. **Imobilização da enzima frutossiltransferase extracelular de *rhodotorula* e aplicação na produção de frutooligossacarídeos.** 2007. 87f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 2007.

OLIVEIRA, V. M. **Formulação de bebida láctea fermentada com diferentes concentrações de soro de queijo, enriquecida com ferro: caracterização físico-química, análises microbiológicas e sensoriais.** 2006. 78f. Dissertação (Mestrado Medicina Veterinária) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense, Rio de Janeiro. 2006.

OLIVEIRA, D. F. de; BRAVO, C. E. C.; TONIAL, I. B.; Soro de leite: um subproduto valioso. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 67, n. 385, 64-71, 2012.

OTIENO, D. O. Synthesis of β -galactooligosaccharides from lactose using microbial β -galactosidases. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 9, p. 471-482, 2010.

PAIGE, D. M. **Lactose Intolerance.** Encyclopedia of Human Nutrition. 3 ed. p. 67–73, 2013.

PANESAR, P. S.; PANESAR, R.; SINGH, R. S.; KENNEDY, J. F.; KUMAR, H. Microbial production, immobilization and applications of beta-D-galactosidase. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 81, n.4, p.530-543. 2006.

PARK, A. R., OH, D. K. Galacto-oligosaccharide production using microbial β -galactosidase: current state and perspectives. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 85, p.1279-1286, 2010.

PARK, H. Y.; KIM, H. J.; LEE, J. K.; KIM, D.; OH, D. K. Galactooligosaccharide production by a thermostable beta-galactosidase from *Sulfolobus solfataricus*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, n. 8, p.1553-1558, 2008.

PEREIRA, M. C. S.; BRUMANO, L. P.; KAMIYAMA, C. M.; PERERIA, J. P. F.; RODARTE, M. P.; PINTO, M. A. O. Lácteos com baixo teor de lactose: uma necessidade para portadores de má digestão da lactose e um nicho de mercado. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, n.389, p.57-65, 2012.

PÉRIS, P. G.; GIMENO, C. V. Evolución en el conocimiento de la fibra. **Nutrición Hospitalaria**, v. 22, n. 2, p. 20-25, 2007.

PERRONE, I. T. **Soro de leite: concentração, cristalização da lactose e secagem**. 2010. 95 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais. 2010.

PESELA, B. C. C.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; FUENTES, M.; VIÁN, L.; GARCÍA, J. L.; CARRASCOSA, A. V.; MATEO, C.; GUISÁN, J. M. Reversible immobilization of a thermophilic β -galactosidase via ionic adsorption on PEI-coated Sepabeads. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 32, p. 369-374, 2003.

PETROVA, V. Y.; KUJUMDZIEVA, A. V. Thermotolerant yeast strains producers of galactooligosaccharides. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 24, n.1, p.1612-1619, 2010.

PETZELBAUER, I.; ZELENY, R.; REITER, A.; KULBE, K. D.; NIDETZKY, B. Development of an ultra-high-temperature process for the enzymatic hydrolysis of

lactose: II. Oligosaccharide formation by two thermostable β -glycosidases. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 69, p. 140–149, 2000.

PRENOSIL, J. E., STUKER, E.; BOURNE, J. R. Formation of oligosaccharides during enzymatic lactose hydrolysis and their importance in a whey hydrolysis process: Part II. Experimental. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 30, p. 1026 - 1031, 1987.

RABIU, B. A., JAY, A. J.; GIBSON, G. R.; RASTALL, R. A. Synthesis and fermentation properties of novel galacto-oligosaccharides by beta-galactosidases from *Bifidobacterium* species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 6, p. 2526-2530, 2001.

RAHIM, K. A. A.; LEE, B. H. Specific inhibitory studies, and oligosaccharide formation by β -galactosidase from psychotrophic *Bacillus subtilis* KL88. **Journal of Dairy Science**, v. 74, p. 1773-1778, 1991.

RASTALL, R.A. Functional Oligosaccharides: application and manufacture. **Annual Reviews of Food Science and Technology**, v. 1, p. 305-339, 2010.

ROBERFROID, M.; SLAVIN, J. Nondigestible oligosaccharides. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 40, n. 6, p. 461-480, 2000.

RODRIGUEZ, V. A.; CRAVERO, B. F.; ALONSO, A. Proceso de elaboración de yogur deslactosado de leche de cabra. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.28, p.109-115, 2008.

RODRIGUEZ-COLINAS, B.; DE ABREU, M. A.; FERNANDEZ-ARROJO, L.; DE BEER, R.; POVEDA, A.; JIMENEZ-BARBERO, J.; HALTRICH, D.; OLMO, A. O. B.; FERNANDEZ-LOBATO, M.; PLOU, F. J. Production of galacto-oligosaccharides by the β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*: Comparative analysis of

permeabilised cells versus soluble enzyme. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 10477-10484, 2011.

RODRIGUEZ-COLINAS, B.; POVEDA, A.; JIMINEZ-BARBERO, J.; BALLESTEROS, A. O.; PLOU, F. J. Galacto-oligosaccharide synthesis from lactose solution or skim milk using β -galactosidase from *Bacillus circulans*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 6391-6398, 2012.

RODRIGUEZ-NOGALES, J. N.; DELGADILLO, A. Stability and catalytic kinetics of microencapsulated β -galactosidase in liposomes prepared by the dehydration–rehydration method. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 33, p. 15–21, 2005.

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

URRUTIA, P.; RODRIGUEZ-COLINAS, B.; FERNANDEZ-ARROJO, L.; BALLESTEROS, A. O.; WILSON, L.; ILLANES, A., FRANCISCO, J. P. Detailed analysis of galacto-oligosaccharides synthesis with b-gal from *Aspergillus oryzae*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, p.1081-1087, 2013.

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

SANGWAN, V.; TOMAR, S. K.; SINGH, R. R. B.; SINGH, A. K.; ALI, B. Galactooligosaccharides: novel components of designer foods. **Journal of Dairy Science**, v. 76, p.103-111, 2011.

SANTIAGO, P.A.; MARQUEZ, L. D. S.; CARDOSO, V. L.; RIBEIRO, E. J. Estudo da produção de β -galactosidase por fermentação de soro de queijo com *Kluyveromyces marxianus*. **Ciência Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 4, p. 567-572, 2004.

SANTOS, R. 2006. 54f. **Produção de galactooligossacarídeo por lactase fúngica**. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 2006.

SANTOS, R.; SIMIQUELI, A. P. R.; PASTORE, G. M. Produção de galactooligossacarídeo por *Scopulariopsis* sp. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 3, p. 682-689, 2009.

SANTOS, W. O. **Participação de β -galactosidase em sistemas aquosos bifásicos constituídos por polietileno glicol e poliacrilato de sódio**. 2011. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Programa de Pós-Graduação da universidade do Sudoeste da Bahia. 2011.

SANZ VALERO, J. I. 2009. 249f. **Production of galacto-oligosaccharides from lactose by immobilized β -galactosidase and posterior chromatographic separation**. Tese (Doutorado em Engenharia Química e Biomolecular) - Ohio State University. 2009.

SATOKARI, R. M.; VAUGHAN, E. E.; AKKERMANS, A. D. L.; SAARELA, M.; DEVOS, W. M. Polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis monitoring of fecal *Bifidobacterium* populations in a prebiotic and probiotic feeding trial. **Syst. Journal of Applied Microbiology**, v. 24, p. 227–231, 2001.

SCHWAB, C.; GANZLE, M. Lactic acid bacteria fermentation of human milk oligosaccharide components, human milk oligosaccharides and galactooligosaccharides. **FEMS Microbiology Letters**, v. 315, p.141-148, 2011.

SENER, N.; KILIC, D.; OZBEK, A. B. A modelling study on milk lactose hydrolysis and β -galactosidase stability under sonication. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 7, p.1493–1500, 2006.

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

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

SPLECHTNA, B.; NGUYEN, T.; STEINBOCK, M.; KULBE, K. D.; LORENZ, W.; HALTRICH, D. Production of prebiotic galacto-oligosaccharides from lactose using β -galactosidases from *Lactobacillus reuteri*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 4999-5006, 2006.

SRIVASTAVA, A.; MISHRA, S.; CHAND, S. Transgalactosylation of lactose for synthesis of galacto-oligosaccharides using *Kluyveromyces marxianus* NCIM 3551. **New Biotechnology**, v. 32, n. 4, p. 412-418, 2015.

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

TANAKA, R.; TAKAYAMA, H.; MOROTOMI, M.; KUROSHIMA, T. Effects of administration of transgalactosylated oligosaccharides and *Bifidobacterium breve* 4006 on human faecal flora. **Bifid. Microflora**, v. 2, p. 7–24, 1983.

TOMAL, A. A. B.; CUNHA, M. E. T.; BOSSO, A.; YOUSSEF, E. Y.; SUGUIMOTO, H. H. Avanços tecnológicos na obtenção, purificação e identificação de

galactooligosacarídeos e estudo de suas propriedades prebióticas. **UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, v.12, p. 41-49, 2010.

TORRES, D.; GONÇALVES, M.; TEIXEIRA, J.; RODRIGUES, L. Galactooligosaccharides: production, properties, applications, and significance as prebiotics. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 9, p. 438-454, 2010.

TRONCO, V. M. **Manual para inspeção da qualidade do leite**. Santa Maria: Editora da UFSM, 2003, 192 p.

TULLIO, L.T. **Isolamento e Caracterização do Glicomacropéptido do Soro de Leite**. 2007. 97f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia em Alimentos) – Programa de Pós-graduação em Tecnologia em Alimentos, Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2007.

TUNGLAND, B. C.; MEYER, D. Non-digestible oligo- and polysaccharides (dietary fiber): their physiology and role in human health and food. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 1, n. 3, p. 90-109, 2002.

TZORTZIS, G.; VULEVIC, J.; **Galactooligosaccharide prebiotics**, In: *Prebiotics and Probiotics: Science and Technology*. Ed. D. Charalampopoulos & R.A. Rastall, Springer Science, New York, 2009, p. 207-244.

USTOK, F. I.; TARI, C.; HARSA, S. Biochemical and thermal properties of β -galactosidase enzymes produced by artisanal yoghurt cultures. **Food Chemistry**, v. 119, p. 1114-20, 2010.

VALSECHI, O. **Tecnologia de produtos agrícolas de origem animal: o leite e seus derivados**. Araras – SP: UFSCar, Centro de Ciências Agrárias, 2001. 36p.

WU, Z.; DONG, M.; LU, M.; LI, Z. Encapsulation of β -galactosidase from *Aspergillus oryzae* based on "fish-in-net" approach with molecular imprinting technique. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 63, p. 75-80, 2010.

ZACARCHENCO, P. B; VAN DENDER, A. G; SPADOTI, L. M; MORENO, I. Soro de leite: de Problema Ambiental à Solução para Tratamento de Doenças. **Leite e Derivados**, n.106, p.139-148, 2008.

ZHANG, J.; ZENG, J.; ZHANG, Y.; WANG, Y.; WANG, Y. Immobilization of β -galactosidase on tamarind gum and chitosan composite microspheres. **Journal of Bioactive and Compatible Polymers**, v. 21, p. 415-432, 2006.

ZHENG, P.; YU, H.; SUN, Z.; NI, Y.; ZHANG, W.; FAN, Y.; XU, Y. Production of galacto-oligosaccharides by immobilized recombinant β -galactosidase from *Aspergillus candidus*. **Biotechnology Journal**, v.1, p. 1464–1470, 2006.

CAPÍTULO 2 – PRODUÇÃO DE GALACTOOLIGOSSACARÍDEOS UTILIZANDO β -GALACTOSIDASE DE *ASPERGILLUS ORYZAE* EM SORO DE LEITE¹

Resumo

O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da produção de galactooligossacarídeos totais (GOS_t) a partir de soro de leite utilizando a enzima comercial β -galactosidase de *Aspergillus Oryzae*. A concentração de soro de leite, pH, temperatura e suas interações foram estatisticamente estudadas por meio da metodologia de superfície de resposta. A concentração de soro de leite igual a 400 g/L, temperatura de 45 °C e pH de 4.5 favoreceram a produção de GOS_t. Nessas condições, houve o aumento de 137% na formação de GOS_t em relação ao ensaio de menor produção. O máximo rendimento e produção de GOS_t foi de 12.97% e 28.72 g/L, respectivamente.

Palavras chaves: *Aspergillus oryzae*, delineamento experimental, prebiótico, soro de leite, β -galactosidase

¹Situação: Será submetido à Food Science and Biotechnology
Adriana Aparecida Bosso Tomal^{a*}, Alessandra Bosso^a, Lucas Caldeirão^a, Fernando Sanches de Lima^a, Elza Iouko Ida^a, Raúl Jorge Hernan Castro Gómez^{a*}.

^a Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos; Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid, Km 380; C.P.: 6001; 86051-970; Londrina – PR, Telefone: + 55 43 3371-4080 *email: adriana_bosso@yahoo.com.br, rcastrog@yahoo.com, telefone: + 55 43 3371-4080

2.1. Introdução

Galactooligosacarídeos (GOS) são os oligossacarídeos provenientes da galactose, estão inclusos como carboidratos não digeríveis, pois são resistentes à hidrólise das enzimas digestivas intestinais e possuem efeitos fisiológicos semelhantes aos das fibras dietéticas (1-3).

Os oligossacarídeos são considerados alimentos funcionais pelas suas características prebióticas (4). Um prebiótico é um ingrediente alimentar não digerível que afeta benéficamente quem o ingere por estimular seletivamente o crescimento e/ou atividade de um número limitado de bactérias no colón, melhorando assim a sua saúde (5).

Dentre os efeitos benéficos dos GOS citados na literatura estão: modificação na microflora colonizadora do cólon; inibição da diarreia; efeito protetor contra infecções no trato gastrintestinal, efeito benéfico no metabolismo de carboidratos e de lipídios, aumento da imunidade celular e aumento na capacidade de absorção de diferentes minerais, como o cálcio reduzindo os riscos de osteoporose (6-10).

Os galactooligosacarídeos podem ser produzidos pela reação de transgalactosilação entre a lactose e a enzima β -galactosidase (11). Esta reação ocorre pela transferência do resíduo de açúcar que forma a porção glicona da molécula do substrato para outra molécula de lactose formando GOS, e quando a transferência é feita para a água, a reação é de hidrólise (12-13). Os GOS formados podem ser compostos de di, tri, tetrassacarídeos e outros sacarídeos mais elevados (14), dentre os compostos formados, os trissacarídeos representaram aproximadamente 80% do total de GOS produzidos (15).

Para uma síntese efetiva de galactooligossacarídeos algumas condições devem ser analisadas, como: temperatura, pH, concentração do substrato e concentração da enzima β -galactosidase (16)

A temperatura e o pH da reação de transgalactosilação tem relação direta com a fonte da enzima, quanto maior a temperatura menor será o tempo teórico de reação, porém a temperatura limite de estabilidade da enzima deve ser respeitada (9).

A β -galactosidase utilizada deve ser termicamente estável e possuir alta atividade de transgalactosilação. A fonte de obtenção desta enzima pode ser proveniente de leveduras, bactérias e fungos filamentosos (17,18). A quantidade de GOS formado é dependente da concentração da lactose, mas não é dependente da concentração da enzima β -galactosidase (8,19). Os substratos utilizados para a produção de GOS devem conter alta concentração de lactose, cercade 400 g/L, desta forma o soro de leite vem sendo estudado como uma alternativa (20). Elevadas quantidades de soro são geradas na fabricação de queijos, e este coproduto gera um problema ambiental. Deste modo, a utilização do soro na produção de GOS pode ser uma alternativa importante para a indústria com a redução de poluição ambiental de 75% e com geração de produtos de interesse na alimentação humana (21).

Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a influência dos parâmetros de produção de GOS a partir do soro de leite utilizando a β -galactosidase comercial de *Aspergillus oryzae* e a aplicação do planejamento fatorial.

2.2. Material e Métodos

2.2.1. Material

O soro de leite em pó integral foi utilizado como matéria prima e adquirido da empresa Confepar® (Londrina, Brasil) e armazenado à temperatura de 4 °C até seu uso.

A enzima utilizada foi a β -galactosidase comercial de *Aspergillus oryzae* Pharmanostra 5000 U/g (BIO-CAT®, Estados Unidos), que foi armazenada a 4 °C até seu uso.

Os reagentes utilizados foram de grau analítico. Os carboidratos utilizados como padrões foram lactose (β -D-galactopiranosil-(1→4)-D-glicose) Sigma, glicose (D(+)-Glicose) Sigma, galactose (D(+)-Galactose) Sigma e 6'-galactosil-lactose (GOS β -1,6), Carbosynth (Berkshire, UK), de grau cromatográfico.

2.2.2. Métodos

2.2.2.1. Produção de GOS

As reações de síntese enzimática de GOS com a enzima β -galactosidase foram realizadas em meio aquoso. O sistema reacional foi composto por soro de leite integral reidratado (20, 30 e 40%) em tampão citrato-fosfato 0,1 M (4.5; 5.0 e 5.5) com adição da enzima β -galactosidase (15 U/mL). O volume total utilizado foi de 100 mL, acondicionados em erlenmeyers de 250 mL. Os frascos foram dispostos em incubadora rotatória orbital (Tecnal, modelo TE- 421) sob agitação de 180 rpm. Para avaliar os parâmetros de produção de GOS foi utilizado o planejamento experimental conforme tabela 1. As variáveis investigadas foram concentração de soro de leite, pH e temperatura.

Assim alíquotas de 5 mL foram coletadas após 2 h de reação, em seguida foram inativadas a 100°C por 5 min e posteriormente congeladas até a quantificação dos açúcares por cromatografia líquida de alta eficiência de troca iônica (HPAEC-PAD).

2.2.2.2. Planejamento fatorial

Foi utilizado o planejamento fatorial 2^3 com 3 repetições no ponto central, totalizando onze ensaios para avaliar os efeitos da temperatura, pH e concentração do soro de leite. As variáveis respostas foram produção de GOS total (GOS_t) e rendimento de GOS total (Y).

As variáveis independentes em níveis reais e codificados estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Matriz experimental (codificada e decodificada), valores de produção de GOS_t, rendimento da produção de GOS_t (Y), conversão de lactose e concentração de GOS β -1,6.

Ensaio	Temperatura (°C)	pH	Cs (g/L)	GOS _t (g/L)	Y (%)	Conversão de lactose (%)	GOS β -1,6 (g/L)
1	-1 (35)	-1 (4.5)	-1 (200)	13.78	9.31	62.05	1.09
2	1 (45)	-1 (4.5)	-1 (200)	12.28	9.78	64.86	0.88
3	-1 (35)	1 (5.5)	-1 (200)	12.12	10.63	36.45	1.38
4	1 (45)	1 (5.5)	-1 (200)	14.73	10.95	47.95	1.33
5	-1 (35)	-1 (4.5)	1 (400)	27.75	11.72	31.32	3.44
6	1 (45)	-1 (4.5)	1 (400)	28.72	12.97	27.39	3.59
7	-1 (35)	1 (5.5)	1 (400)	23.59	11.15	6.02	3.50
8	1 (45)	1 (5.5)	1 (400)	24.69	13.36	18.63	3.26
9	0 (40)	0 (5.0)	0 (300)	23.45	13.52	42.40	2.18
10	0 (40)	0 (5.0)	0 (300)	23.13	11.86	56.94	2.14
11	0 (40)	0 (5.0)	0 (300)	22.93	12.64	45.08	2.13

Os níveis de temperatura e pH utilizados foram conforme o perfil típico de β -galactosidase proveniente de *A. oryzae* (15, 23). Enquanto que as concentrações de soro de leite utilizadas foram definidas conforme Lisboa et al. (24), Splechna et al. (25), Hsu et al. (14) e Urrutia et al. (23).

2.2.2.3. Métodos Analíticos

2.2.2.3.1. Caracterização química do soro

O soro doce foi caracterizado de acordo com AOAC (22) contendo (m/m) em base seca para proteína (17.09% \pm 0.36), minerais (9.02% \pm 0.01), lipídeos (2,93% \pm 0,14), Já a quantificação de glicose (0.63% \pm 0.07), galactose (2.05% \pm 0.09) e lactose (68.28% \pm 0.24) foram analisadas por HPAEC-PAD (high performance anion exchange chromatography).

2.2.2.3.2. Produção de GOS

A produção de GOS total foi calculada de acordo com a equação 1, adaptada da AOAC 2001.02 (26). Foi considerada que o galactose transgalactosilada (Gal_{trans}) é a diferença entre a galactose hidrolisada (Gal_h) e a galactose hidrolisada teórica (Gal_{ht}), onde a Gal_{ht} corresponde a glicose total liberada nos ensaios (equação 2). O

fator de correção k (equação 3) indica a relação de quantas moléculas de galactoses liberadas são necessárias para formar uma molécula de GOS. Com base estequiométrica foi admitindo que um GOS é formado a partir de uma molécula de lactose ligada a outra de galactose, dessa forma cada GOS possui duas moléculas de galactose (n). Enquanto o rendimento da produção de GOS_t (Y) foi calculado de acordo com a equação 4, proposta por Hsu et al. (14) e a conversão de lactose calculado conforme a equação 5.

$$GOS_t = Gal_{trans} * 1.4 \quad (1)$$

$$Gal_{trans} = Gal_n - Gal_{nt} \quad (2)$$

$$k = \frac{(180 + 162.n)}{180.n} \quad (3)$$

$$Y(\%) = \frac{GOS_t}{Gal + Glic + Lac + GOS_t} * 100 \quad (4)$$

$$Convers\~ao\ de\ Lactose\ (\%) = \frac{Lac_i - Lac_r}{Lac_i} * 100 \quad (5)$$

Os dados obtidos foram tratados no software Estatística 7.0 (StatSoft®)

2.2.2.3.3. Quantificação do teor de carboidratos por cromatografia líquida de alta eficiência de troca iônica

Após a produção de GOS as amostras dos 11 experimentos foram filtradas em membrana hidrofílica PVDF de 0,22 µm de tamanho de poro (Millipore, Billerica, MA, EUA) e analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência de troca iônica (HPAEC-PAD, modelo 5000 ICS, Dionex Canada Ltd., Oakville, Canada). Alíquotas (10 µl) do filtrado foram automaticamente injetadas no cromatógrafo e os carboidratos foram separados em coluna analítica CarboPac® PA1 (250 mm x 4 mm; 10 µm de tamanho de partícula; Dionex Corporation, Sunnyvale, CA, EUA) precedido por uma pré-coluna CarboPac® PA1 (50 mm x 4 mm). As corridas cromatográficas foram realizadas a uma vazão de 1 mL/min a 25 °C, sendo que as etapas e proporções dos solventes utilizados estão detalhadas na Tabela 2. A

quantificação do teor de açúcares foi feita por meio de calibrações externas a partir de soluções-padrão de galactose (1 a 40 µg/mL), glicose (0,5 a 50 µg/mL), lactose (0,5 a 150 µg/mL) e 6'-galactosil-lactose (3 a 55 µg/mL). Os padrões também foram utilizados para identificar os carboidratos com base nos seus tempos de retenção. A aquisição e tratamento dos dados foram realizados utilizando o software Chromeleon versão 6.8 (Dionex Corporation).

Tabela 2. Condições da corrida cromatográfica para a separação de açúcares.

Etapa	Solvente A* (%)	Solvente B* (%)	NaOH resultante (mmol/L)	Tempo (min)
Separação	95	5	10	0 a 60
Limpeza	0	100	200	60 a 61
	0	100	200	61 a 66
Equilíbrio/ condicionamento	95	5	10	66 a 67
	95	5	10	67 a 85

Solvente A = água ultra pura

Solvente B= NaOH 200 mmol/L

2.3. Resultados e Discussão

2.3.1. Produção enzimática de GOS

Os resultados referentes à quantidade de galactose, glicose, lactose e GOS_t de cada ensaio após duas horas de reação estão apresentados na Figura 1, indicando que a quantidade de cada carboidrato é diferenciada de acordo com a condição reacional.

A atividade de transgalactosilação da enzima comercial β- galactosidase de *A. oryzae* pôde ser comprovada pela formação de galactooligossacarídeos em todos os ensaios (Fig. 1). No ensaio 2 a relação entre a baixa concentração de GOS_t e alta conversão de lactose indica que a enzima apresentou maior atividade de hidrólise do que de transgalactosilação, contrário ao que ocorre com o ensaio 7, onde grande parte da lactose hidrolisada foi utilizada para transgalactosilação, observado pela

baixa conversão de lactose (6.02%) e maior produção de GOS_t (23.59 g/L) em relação ao ensaio 2.

Os resultados dos ensaios 1 a 4, que possuem menores concentrações de soro de leite (Cs), indicam que para favorecer a síntese de galactooligossacarídeos a concentração inicial do soro de leite deve ser maior que 20%.

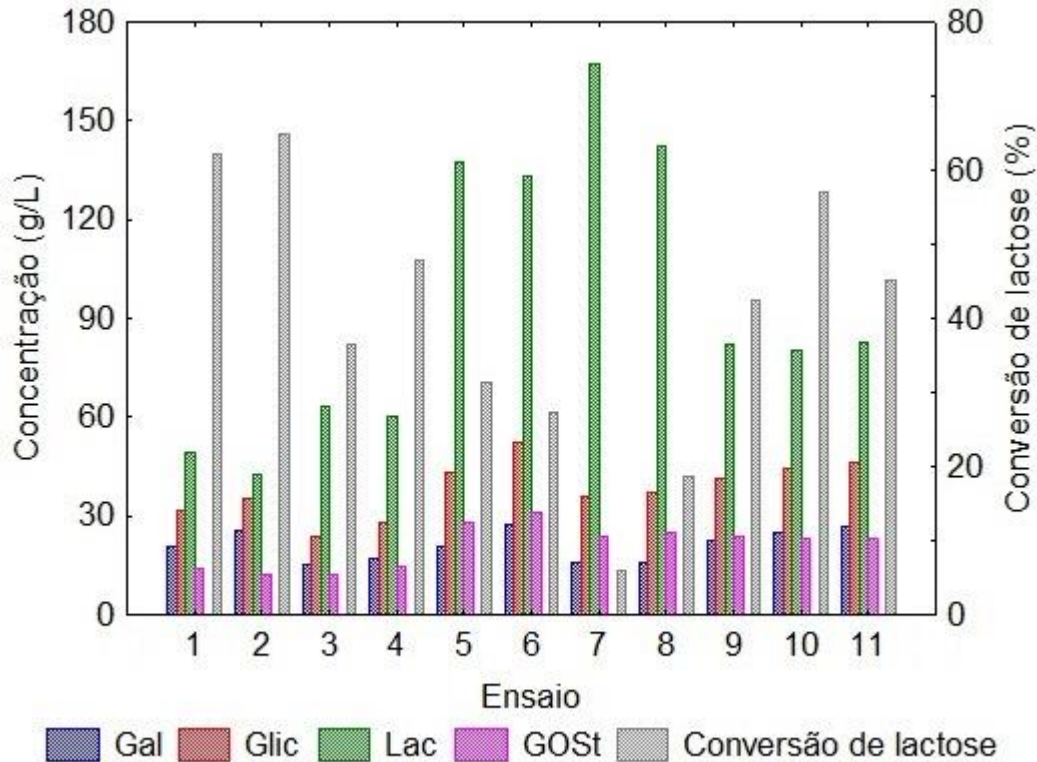
Em todos os ensaios foram verificados maior concentração de glicose em relação à galactose, uma vez que a glicose liberada não é utilizada na transgalactosilação para produção de GOS, já a galactose é utilizada na síntese de galactooligossacarídeos, justificando o acúmulo de glicose e a menor concentração de galactose no meio.

A produção de GOS_t nos ensaios analisados variou de 12.12 a 28.72 g/L, sendo o ensaio 6 o que obteve maior concentração, indicando que as condições de ensaio utilizadas influenciaram diretamente na síntese de galactooligossacarídeos.

Conforme estudos já realizados, na reação de transgalactosilação catalisada pela β -galactosidase, os galactooligossacarídeos formados em maior quantidade são os trissacarídeos, esse fato se justifica pelos trissacarídeos serem precursores para a síntese dos tetrassacarídeos (17, 27, 28, 29) Urrutia et al. (23) relataram em seu estudo que cerca de um terço do total de GOS sintetizado utilizando *A. oryzae* foi trissacarídeos. Dentre os trissacarídeos sintetizados o 6'-galactosil-lactose (GOS β -1,6) foi formado em maior concentração quando comparados ao 4'-galactosil-lactose (GOS β -1,4) e 3'-galactosil-lactose (GOS β -1,3) (30, 31).

No presente estudo, a porcentagem de GOS β -1,6 em relação ao GOS_t sintetizado representou de 7.9% (Ensaio 1) a 14.83% (Ensaio 7). Para o ensaio 6, de maior produção de GOS_t a forma GOS β -1,6 foi 12.5% do total de galactooligossacarídeos produzidos (Tab.1).

Figura 1. Composição de carboidratos do soro de leite após a ação da β -galactosidase de *A. oryzae* e conversão de lactose.



2.3.2. Efeito da temperatura, pH e concentração do soro de leite (Cs)

Com base nos resultados do experimento fatorial, mostrados na Tabela 1, foram geradas equações empíricas codificadas (Eq. 5 e 6) para descrever o comportamento e maximizar a produção de GOS totais (GOS_t) e rendimento de GOS_t (Y) em função das variáveis independentes, temperatura (T), pH e concentração de soro de leite (C_s) nos níveis estudados. Os coeficientes de correlação foram respectivamente, 0.994 e 0.919 para os modelos de produção de GOS_t e rendimento da produção de GOS_t (Y), demonstrando um elevado ajuste dos dados. A regressão mostrou-se significativa no teste F da análise de variância (ANOVA, $p < 0.05$) sendo que o F_{cal} foi 114.35 e 7.58, superiores ao valor crítico ($F_{tab} = 6.16$), para os modelos de GOS_t e rendimento (Y), respectivamente.

$$GOS_t(g/L) = 19.711 + 0.397T - 0.923pH + 6.480C_s + 0.539TpH - 1.120pHC_s + 3.463 \quad R^2 = 0.994 \quad (5)$$

$$Y(\%) = 11.235 + 0.533T + 0.288pH + 1.064Cs + 0.333TCs - 0,336pHCs + 1.440 \quad R^2 = 0.919 \quad (6)$$

A partir dos modelos empíricos gerados e dos resultados do experimento fatorial fracionado, é possível observar que a temperatura exerce um efeito positivo e significativo ($p < 0,05$) sobre as médias, entretanto, este efeito representa um aumento de apenas 2% e 4.74% sobre a produção de GOS_t e rendimento de GOS_t, respectivamente. A variável pH demonstrou comportamento distinto nos modelos, onde para a produção de GOS_t o efeito foi significativo e negativo, ou seja, em pH 4.5 a média é aumentada em 4.68%, 2.37 vezes maior que o efeito da temperatura. Para o rendimento de GOS_t (Y), os valores de pH estudados não exerceram efeitos significativos.

A concentração de soro (Cs) exerceu o maior efeito positivo sobre as médias, este efeito foi significativo e positivo para ambas as respostas, aumentando as médias em 32.87% para GOS_t e 9.47% para o rendimento de GOS_t. Por meio das superfícies de contorno, é possível observar que para a produção de GOS_t o efeito da temperatura é independente da concentração de soro de leite (Fig. 3B). O efeito da temperatura torna-se mais dependente do pH quando este está em valores mais altos, sendo completamente independente do pH no nível inferior estudado (Fig. 3A). Já para o pH em relação à concentração de soro (Fig. 3C), a dependência é maior nos valores extremos das variáveis. Quanto ao rendimento de GOS_t (Y), O pH é independente da temperatura (3D) e a temperatura é dependente da concentração de soro (Cs), onde o aumento dos níveis, aumenta a resposta de rendimento (3E). A interação concentração de soro e pH (3F) é maior nas condições de menor concentração de soro e independente no maior nível.

As condições estudadas indicam que a produção de GOS é aumentada quando há um aumento da concentração do soro de leite (Cs), resultados condizentes com Neri et al. (32) que estudaram a produção de GOS utilizando β-galactosidase de *Aspergillus oryzae* variando a concentração inicial de lactose entre 5 a 50% em 40 °C e pH 4.5. Em baixas concentrações de lactose, a transgalactosilação é inferior à hidrólise, pois a quantidade de grupos hidroxila de carboidratos é baixa, resultando em uma maior quantidade de glicose e galactose na solução (33).

De acordo com os resultados apresentados e o perfil de desejabilidade indicado pelos modelos, a temperatura (T) deve ser de 45 °C, pH de 4.5 e concentração de soro (Cs) igual a 400 g/L, para a maximização do rendimento e produção de GOS_t, desta maneira, é incorporada à média os efeitos de interação, representando juntos um aumento de 5.68% e 5.95% sobre as médias de GOS_t e rendimento da produção de GOS_t respectivamente. Nestas condições, o modelo matemático, indica 28,10 g/L de GOS_t e 13.21% de rendimento de GOS_t. O ensaio 6 representa esta condição, onde a produção de GOS_t foi de 28.72 g/L e 12.97% de rendimento, esses valores são 102.20% e 98.18% dos valores preditos para a produção de GOS_t e rendimento de GOS_t, mostrando uma alta confiabilidade no modelo matemático.

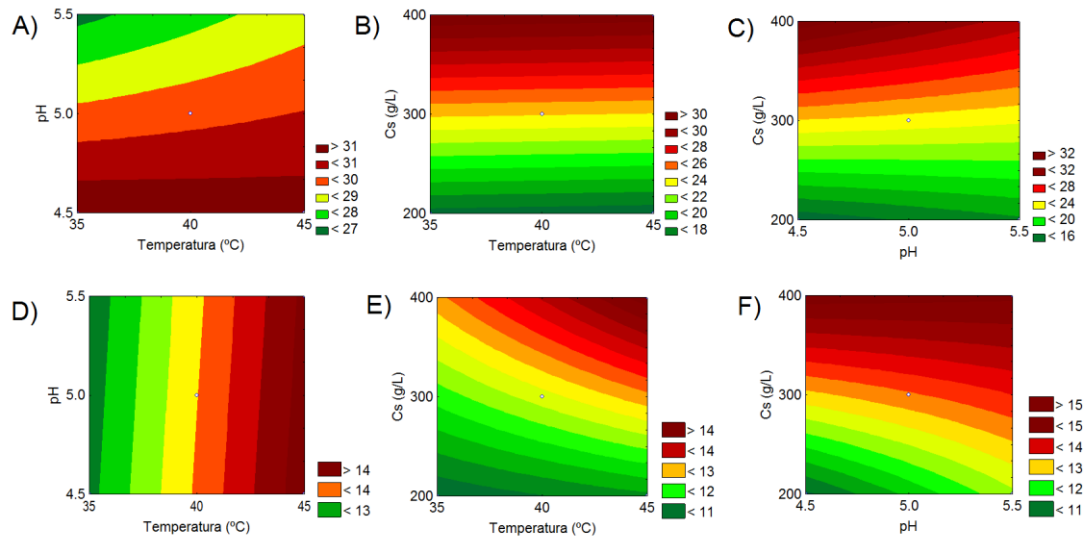
O maior rendimento nos ensaios realizados foi de 13.52% (ensaio 9) e 12.97% (ensaio 6) que condiz com a maximização do rendimento de GOS_t. Este resultado foi superior ao encontrado por Fischer e Kleinschmidt (34) que utilizando β-galactosidase de *A. oryzae* em soro de leite doce obtiveram um rendimento de GOS de 10.93%, entretanto outros estudos mostram maiores rendimentos de GOS também utilizando β-galactosidase de *A. oryzae* em solução de lactose PA. Chen et al. (11) atingiram 31% de rendimento utilizando 40% lactose inicial. Vera et al. (35) também estudaram a produção de GOS utilizando β-galactosidase da mesma fonte fúngica, tendo rendimento de 29% em uma concentração de lactose inicial de 50%, temperatura de 47.5 °C e pH 4.5.

Outros autores estudaram a produção de GOS a partir da β-galactosidase de *A. oryzae* imobilizada e os rendimentos obtidos foram maiores do que os obtidos neste trabalho com a enzima livre. Albayrak e Yang (36) usaram β-galactosidase de *A. oryzae* imobilizada em pano de algodão em meio contendo 400g/L de lactose, pH 4.5 e 40 °C e obtiveram 26% de rendimento na produção de GOS. Neri et al. (32) utilizaram β-galactosidase de *A. oryzae* imobilizada em partículas magnéticas revestidas com polianilina em uma solução de 500 g/L de lactose inicial a 40 °C e pH 4.5 e a produção de GOS resultou em 26.1% de rendimento.

Estudos indicam que diferentes fontes de enzima β-galactosidase utilizadas na produção de GOS exercem influência no rendimento de GOS. Cruz et al. (37), utilizando β-galactosidase de *Penicillium simplicissimum* com concentração inicial de lactose de 60%, obtiveram 30.5% de GOS. Splechtna et al. (25) alcançaram, em seus experimentos, 36% de rendimento utilizando β-galactosidase de *Lactobacillus*

reuteri em uma concentração inicial de lactose de 20%. Hsu et al. (33), utilizando β -galactosidase de *Bifidobacterium longum* BCRC 157C8, chegaram a 32.5% de rendimento utilizando solução de lactose a 40%. Já Lisboa et al. (24) estudaram a produção de GOS utilizando β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* (Lactozym® 3000L) em soro de leite atingiram o rendimento de 29.9%.

Figura 2. Superfície de contorno para concentração de GOS_t e rendimento da produção de GOS (Y), respectivamente, com as funções de T e pH (Cs = 400 g/L) (A e D), T e Cs (pH = 4.5) (B e E) e pH e Cs (T = 45 °C) (C e F).



2.4. Conclusão

A metodologia de superfície de resposta mostrou-se eficiente para o estabelecimento das condições de temperatura, pH e concentração de soro de leite na maximização da produção de GOS. Com base nos resultados deste trabalho, os autores concluem que o soro de leite é um substrato desejável para a produção de um alimento prebiótico ou como ingrediente de um alimento funcional.

2.5. Agradecimentos

Os autores gostariam de agradecer à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) e Universidade Estadual de Londrina (UEL) pelo apoio financeiro.

2.6. Referência

- (1) Tomal AAB, Cunha MET, Bosso A, Youssef EY, Suguimoto HH. Avanços tecnológicos na obtenção, purificação e identificação de galactooligosacarídeos e estudo de suas propriedades prebióticas. UNOPAR Cient Ciênc Biol Saúde. 12: 41-49 (2010)
- (2) Morishita Y, Oowada T, Ozaki A, Mizutani T. Galactooligosaccharide in combination with *Bifidobacterium* and *Bacteroides* affects the population of *Clostridium perfringens* in the intestine of gnotobiotic mice. Nutrition. Res. 22: 1333-41(2002)
- (3) Gaggia F, Mattarelli P, Biavati B. Review Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production. Int J Food Microbiol.141: 15-28 (2010)
- (4) Sanz Valero JI. Production of galacto-oligosaccharides from lactose by immobilized β -galactosidase and posterior chromatographic separation. Tese, Ohio State University, 2009.
- (5) Schoterman HC. Galacto-oligosaccharides: Properties and health aspects. Advanced Dietary Fibre Technology. 42: 494-502 (2007)
- (6) Mussatto SI, Mancilha IM. Non-digestible oligosaccharides: a review. Carbohydrate Pol.68: 587-97 (2007)
- (7) Rivero-Urgell M, Santamaria-Orleans A. Oligosaccharides: application in infant food. Early Hum Dev. 65: 43-52 (2001)

- (8) Chockchaisawasdee S, Athanasopoulos VI, Niranjana K, Rastall RA. Synthesis of galacto-oligosaccharide from lactose using β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*: studies on batch and continuous UF membrane-fitted bioreactors. *Biotechnol Bioeng.* 89: 434–443 (2005)
- (9) Czermak P, Ebrahimi M, Grau K, Netz S, Sawatzki G, Pfrohm PH. Membrane-assisted enzymatic production of galactosyl-oligosaccharides from lactose in a continuous process. *Journal of Membrane Science.* 232: 85-91 (2004)
- (10) Almeida MM, Pastore GM. Açúcares funcionais galactooligosacarídeos. Produção de galactooligosacarídeos por β -galactosidase utilizando metodologia de superfície de resposta. *Biotechnol Cienc Desenvol.* 33: 10-14 (2004)
- (11) Chen SX, Wei DZ, Hu ZH. Synthesis of galactooligosaccharides in AOT/isooctane reverse micelles by β -galactosidase. *J Mol Catal B Enzym.* 16: 109-114 (2001)
- (12) Akiyama K, Takase M, Horikoshi K, Shigeo O. Production of galactooligosaccharides from lactose using a β -glucosidase from *Thermus* sp. Z-1. *Biosci. Biotech Bioch.* 65: 438-441 (2001)
- (13) Martins AR, Burkert CAV. Revisão-Galactooligosacarídeos (GOS) e seus efeitos prebióticos e bifidogênicos. *Braz J Food Technol.* 12: 230-40 (2009)
- (14) Hsu, CA, Yu RC, Chou CC. Production of β -galactosidase by Bifidobacteria as influenced by various culture conditions. *International Journal of Food Microbiology,* 104: 197-206 (2005)
- (15) Neri DMF, Balcao VM, Costa RS, Rocha ICAP, Ferreira EMFC, Torres DPM, Rodrigues L, Carvalho L, Teixeira JAC. Galacto-oligosaccharide production during

lactose hydrolysis by free *Aspergillus oryzae* β -galactosidase and immobilized on magnetic polysiloxanepolyvinyl alcohol. *Food Chem.* 115: 92–99 (2009)

(16) Mahoney RR. Galactosyl-oligosaccharide formation during lactose hydrolysis: a review. *Food Chemistry*. 63: 147-154 (1998)

(17) Cardelle-Cobas A, Corzo N, Villamiel M, Olano A. Isomerization of lactose-derived oligosaccharides: a case study using sodium aluminate. *J Agric Food Chem.* 56: 10954- 10959 (2008)

(18) Longo G. Influência da adição de lactase na produção de iogurtes. Dissertação, Universidade Federal do Paraná, Paraná, Brasil (2006)

(19) Santos R. Produção de Galactooligossacarídeo por lactase fúngica. Dissertação, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, Brasil (2006)

(20) Hatzinikolaou D.G, Katsifas E, Mamma D, Karagouni A, Christakopoulos P, Kekos D. Modeling of the simultaneous hydrolysisultrafiltration of whey permeate by a thermostable β -galactosidase from *Aspergillus niger*. *Process Biochemistry*. 24: 161-172 (2005)

(21) Andrade RLP, Martins JFP. Influência da adição da fécula de batata-doce sobre a viscosidade do permeado de soro de queijo. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 22: 249-253 (2002)

(22) AOAC. Official Methods of Analysis of AOAC Intl. 16th ed. Methods 930.29, 930.30, 932.06, and 937.05. Association of Official Analytical Communities, Arlington, VA, USA (1995)

(23) Urrutia P, Rodriguez-Colinas B, Fernandez-Arrojo L, Ballesteros AO, Wilson L, Illanes A, Plou FJ. Detailed analysis of galacto-oligosaccharides synthesis with b-gal

from *Aspergillus oryzae*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 61: 1081-1087 (2013)

(24) Lisboa CR, Martinez LS, Trindade RA, Costa, FAA, Burkert JFM, Burkert CAV. Response surface methodology applied to the enzymatic synthesis of galacto-oligosaccharides from cheese whey. Food Science and Biotechnology. 21: 1519-1524 (2012)

(25) Splechtna B, Nguyen T, Haltrich D. Comparison between discontinuous and continuous lactose conversion processes for the production of prebiotic galacto-oligosaccharides using β -galactosidase from *Lactobacillus reuteri*. J Agric Food Chem.55: 6772–6777 (2007)

(26) AOAC. Official Methods of Analysis of AOAC Intl. official method 2001. 02 trans-Galactooligosaccharides (TGOS),” in Selected Food Products, AOAC International, Gaitl colinas hersburg, Md, USA, 2005.

(27) SANTOS R, SIMIQUELI APR, PASTORE GM. Produção de galactooligosacarídeo por *Scopulariopsis* sp. Ciênc. Tecnol. Aliment. 29: 682-689 (2009)

(28) Berger JL, Lee BH, Lacroix C. Immobilization of β -galactosidase from *Thermus Aquaticus* YT-1 for oligosaccharides synthesis. Biotechnol Lett. 9: 601-606 (1995)

(29) Martinez-Villaluenga C, Cardelle-Cobas A, Corzo N, Olano A. Study of galactooligosaccharide composition in commercial fermented milks. J Food Compos Anal. 21: 540-544 (2008)

(30) Gaur R, Pant H, Jain R, Khare SK. Galacto-oligosaccharide synthesis by immobilized *Aspergillus oryzae* b-galactosidase. Food Chem. 97: 426-430 (2006)

- (31) Gosling A, Stevens GW, Barber AR, Kentish SE, Gras SL. Recent advances refining galacto-oligosaccharide production from lactose. *Food Chemistry*. 121: 307-318 (2010)
- (32) Neri, D. F. M.; Balcao, V. M.; Cardoso, S. M.; Silva, A. M. S.; Domingues, M. D. R. M.; Torres, D. P. M.; Rodrigues, L. R. M.; Carvalho, L. B.; Teixeira, J. A. C. Characterization of galactooligosaccharides produced by β -galactosidase immobilized onto magnetized Dacron. *Int. Dairy J.* 2011, 21, 172–178.
- (33) Hsu CA, Lee SL, Chou CC. Enzymatic production of galactooligosaccharides by beta-galactosidase from *Bifidobacterium longum* BCRC 15708. *J. Agric. Food Chem.* 55: 2225–2230 (2007)
- (34) Fischer C, Kleinschmidt T. Synthesis of galactooligosaccharides using sweet and acid whey as a substrate. *International Dairy Journal*. 48: 15-22 (2015)
- (35) Vera C, Guerrero C, Conejeros R, Illanes A. Synthesis of galacto-oligosaccharides by β -galactosidase from *Aspergillus oryzae* using partially dissolved and supersaturated solution of lactose. *Enzyme Microb. Technol.* 50: 188–194 (2012)
- (36) Albayrak N, Yang ST. Production of galacto-oligosaccharides from lactose by *Aspergillus oryzae* beta-galactosidase immobilized on cotton cloth. *Biotechnol. Bioeng.* 77: 8–19 (2002)
- (37) Cruz R, Cruz VA, Belote JG, Khenayfes MO, Dorta C, Oliveira LHS, Ardiles E and Galli A. Production of trans-galactosylated oligosaccharides (TOS) by galactosyltransferase activity from *Penicillium simplicissimum*. *Bioresource Technology*. 70: 165-171 (1999)

Capítulo 3 – EFEITO DAS CONDIÇÕES DE OBTENÇÃO ENZIMÁTICA DE GALACTOOLIGOSSACARÍDEOS POR β -GALACTOSIDASE DE *KLUYVEROMYCES LACTIS*²

Resumo

Neste estudo, foi realizada a obtenção galactooligossacarídeos (GOS) a partir do soro de leite utilizando β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* comercial (Maxilact® LX 5000). Os efeitos das variáveis independentes concentração de soro de leite em pó, temperatura e pH da reação sobre as variáveis dependentes produção de GOS totais (GOS_t) e rendimento de GOS_t (Y) foram avaliados utilizando um planejamento fatorial 2³. Os valores máximos das variáveis-resposta foram encontrados após 2 horas de síntese em um sistema reacional composto por 400 g/L de soro de leite a 40 °C e pH 6.0, adicionado de 15 U/mL de enzima. Sob estas condições, a produção de GOS_t e rendimento de GOS_t foram de 28.94 g/L e 10.12%, respectivamente. Adicionalmente, a conversão de lactose foi de 91.35% e a formação do trissacarídeo 6'-galactosil-lactose (GOS β -1,6) foi de 9.10%. A utilização de soro de leite em pó e enzima β -galactosidase de *K. lactis* é viável para produção de um alimento rico em GOS_t e de baixo teor de lactose.

Palavras chaves: *Kluyveromyces lactis*, planejamento fatorial, prebiótico, soro de leite doce, β -galactosidase

²Situação: Será submetido à Journal of Agricultural and Food Chemistry

Adriana Aparecida Bosso Tomal^{a*}, Alessandra Bosso^a, Lucas Caldeirão^a, Fernando Sanches de Lima^a, Elza Louko Ida^a, Raúl Jorge Hernan Castro Gómez^{a*}.

^a Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos; Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid, Km 380; C.P.: 6001; 86051-970; Londrina – PR, Telefone: + 55 43 3371-4080 *email: adriana_bosso@yahoo.com.br, rcastrog@yahoo.com, telefone: + 55 43 3371-4080

3.1. Introdução

O soro de leite, coproduto da indústria de laticínios, corresponde à fração aquosa do leite que se obtém durante a coagulação nos processos de produção de queijos ou caseína, sendo constituído por proteínas, carboidratos, gordura e sais (GHALY et al., 2004; PRAZERES; CARVALHO; RIVAS, 2012).

A imposição de controles rígidos no descarte de efluentes no meio ambiente e o reconhecimento do soro como potencial fonte de nutrientes tem tornado o soro de leite atrativo para o seu uso em processos biotecnológicos, como na produção de galactooligosacarídeos (GOS) (SCHOLZ, 2011).

GOS são oligossacarídeos formados por ligações glicosídicas por até 9 unidades de galactose e uma glicose terminal que são produzidos por transgalactosilação da lactose utilizando β -galactosidase de diversas fontes (MATELLA; DOLAN; LEE, 2006).

Os oligossacarídeos são açúcares encontrados naturalmente em muitos alimentos como frutas, vegetais, leite e mel. Alguns oligossacarídeos apresentam atividade fisiológica além da função nutricional ou de adoçamento, sendo assim denominados de alimentos funcionais (ALMEIDA e PASTORE, 2004). Estes carboidratos melhoram a qualidade dos alimentos, promovendo uma modificação no “flavor”, nas características físico-químicas e também apresentando propriedades benéficas para a saúde do consumidor (CRITTENDEN e PLAYNE, 1996).

A produção dos oligossacarídeos a partir de lactose presente no soro de leite tem atraído a atenção de pesquisadores e da indústria de alimentos pelo potencial uso como ingredientes prebióticos em alimentos funcionais (LISBOA, 2008).

Os GOS são resistentes à hidrólise das enzimas digestivas intestinais e possuem efeitos fisiológicos semelhantes ao das fibras dietéticas (MORISHITA et al., 2002). A ingestão de oligossacarídeos estimula a proliferação de *Bifidobacterium* spp e *Lactobacillus* spp no intestino, ocasionando um considerável benefício à saúde humana (DAVIS et al., 2010). Um outro benefício que resulta da transformação de lactose em galactooligosacarídeos é a produção de um leite com baixa concentração de lactose. Muitos indivíduos sofrem com problemas gastrintestinais por causa do elevado índice de lactose nos produtos derivados do leite, doença conhecida como intolerância à lactose (CURDA et al., 2006).

Na população adulta humana, os índices de intolerância à lactose são elevados, sendo estimados em 70% na América do Sul e África, podendo chegar a próximo de 100% em alguns países da Ásia, como na China e Tailândia. A incidência em brasileiros varia conforme a etnia, onde aproximadamente 57% da população branca apresenta intolerância, mas o número é maior entre os brasileiros negros (80%) e de origem japonesa (100 %) de 46 a 67%, dependendo da etnia (TOMAL et al., 2010).

A formação de GOS a partir da lactose é influenciada por diversos fatores como a fonte da enzima, pH, concentração da enzima, temperatura e concentração do substrato (BOON; JANSSEN; RIET, 2000; CARDELLE-COBAS et al., 2008).

A temperatura e o pH ótimo para a ação da β -galactosidase na produção de GOS têm uma relação direta com a origem da enzima (BOON; JANSSEN; RIET, 2000). Quanto maior a temperatura menor será o tempo teórico de reação, respeitando-se o limite de estabilidade enzimática (CZERMAK, 2004).

A quantidade de GOS formado é dependente da concentração da lactose, mas não é dependente da concentração da enzima (CHOCKCHAIWASDEE et al.; 2005). Os substratos utilizados para a produção de GOS devem conter alta concentração de lactose, desta forma, o soro de leite em pó vem sendo estudado como uma alternativa viável na transgalactosilação e obtenção de GOS.

O objetivo foi estudar a influência da temperatura, pH e concentração de lactose na obtenção de galactooligossacarídeos tendo como substrato o soro de leite, utilizando a enzima β -galactosidase comercial de *Kluyveromyces lactis*.

3.2. Material e Métodos

3.2.1. Material

O soro de leite em pó integral foi utilizado como matéria prima e adquirido da empresa Confepar® (Londrina, Brasil) e armazenado à temperatura de 4 °C até seu uso.

A enzima utilizada foi a β -galactosidase comercial de *Kluyveromyces lactis* Maxilact® LX 5000 (DSM FOOD SPECIALITIES), que foi armazenada a 4 °C até seu uso.

Os reagentes utilizados foram de grau analítico. Os carboidratos utilizados como padrões foram lactose (β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 4)-D-glicose) Sigma, glicose (D(+)-Glicose) Sigma, galactose (D(+)-Galactose) Sigma e 6'-galactosil-lactose (GOS β -1,6), Carbosynth (Berkshire, UK), de grau cromatográfico.

3.2.2. Métodos

3.2.2.1. Produção de GOS

As reações de síntese enzimática de GOS com a enzima β -galactosidase foram realizadas em meio aquoso. O sistema reacional foi composto por soro de leite integral reidratado (20, 30 e 40%) em tampão fosfato de sódio 0,1 M (6.0; 6.5 e 7.0) com adição da enzima β -galactosidase (15 U/mL). O volume total utilizado foi de 100 mL, acondicionados em erlenmeyers de 250 mL. Os frascos foram dispostos em incubadora rotatória orbital (Tecnal, modelo TE- 421) sob agitação de 180 rpm. Para avaliar os parâmetros de produção de GOS foi utilizado o planejamento experimental conforme tabela 1. As variáveis investigadas foram concentração de soro de leite, pH e temperatura.

Assim alíquotas de 5 mL foram coletadas após 2 h de reação, em seguida foram inativadas a 100°C por 5 min e posteriormente congeladas até a quantificação dos açúcares por cromatografia líquida de alta eficiência de troca iônica (HPAEC-PAD).

3.2.2.2. Planejamento fatorial

Foi utilizado o planejamento fatorial 2^3 com 3 repetições no ponto central, totalizando onze ensaios para avaliar os efeitos da temperatura, pH e concentração do soro de leite. As variáveis respostas foram produção de GOS total (GOS_t) e rendimento de GOS total (Y).

As variáveis independentes em níveis reais e codificados estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Matriz experimental (codificada e decodificada), valores de concentração de GOS_t, rendimento da produção de GOS_t (Y), conversão de lactose e concentração de GOS β-1,6.

Ensaio	Temperatura (°C)	pH	Cs (g/L)	GOS _t (g/L)	Y (%)	Conversão de Lactose (%)	GOS β-1,6 (%)
1	-1 (30)	-1 (6.0)	-1 (200)	13,79	9,45	96,69	6,38
2	1 (40)	-1 (6.0)	-1 (200)	14,63	10,22	100,00	5,68
3	-1 (30)	1 (7.0)	-1 (200)	14,09	10,50	70,66	8,07
4	1 (40)	1 (7.0)	-1 (200)	15,11	10,95	87,49	8,21
5	-1 (30)	-1 (6.0)	1 (400)	21,58	9,19	62,94	11,76
6	1 (40)	-1 (6.0)	1 (400)	28,94	10,12	91,35	9,10
7	-1 (30)	1 (7.0)	1 (400)	15,74	5,63	45,17	18,16
8	1 (40)	1 (7.0)	1 (400)	25,60	8,44	62,61	11,11
9	0 (35)	0 (6.5)	0 (300)	23,21	11,37	86,20	7,93
10	0 (35)	0 (6.5)	0 (300)	22,97	11,68	84,64	8,00
11	0 (35)	0 (6.5)	0 (300)	23,60	11,54	86,24	7,73

Os níveis de temperatura e pH utilizados foram conforme o perfil típico de β-galactosidase proveniente de *K. lactis* (CHOCKCHAIWASDEE et al., 2005). Enquanto que as concentrações de soro de leite utilizadas foram definidas conforme Martínez-Villaluenga et al. (2008); Lisboa et al. (2012), Rodriguez-Colinas et al. (2011).

3.2.2.3. Métodos Analíticos

3.2.2.3.1. Caracterização química do soro

O soro doce foi caracterizado de acordo com AOAC (22) contendo (m/m) em base seca para proteína (17.09% ± 0.36), minerais (9.02% ± 0.01), lipídeos (2,93% ± 0,14), Já a quantificação de glicose (0.63% ± 0.07), galactose (2.05% ± 0.09) e lactose (68.28% ± 0.24) foram analisadas por HPAEC-PAD (high performance anion exchange chromatography).

3.2.2.3.2. Produção de GOS

A produção de GOS total foi calculada de acordo com a equação 1, adaptada da AOAC 2001.02 (26). Foi considerada que o galactose transgalactosilada (Gal_{trans})

é a diferença entre a galactose hidrolisada (Gal_h) e a galactose hidrolisada teórica (Gal_{ht}), onde a Gal_{ht} corresponde a glicose total liberada nos ensaios (equação 2). O fator de correção k (equação 3) indica a relação de quantas moléculas de galactoses liberadas são necessárias para formar uma molécula de GOS. Com base estequiométrica foi admitindo que um GOS é formado a partir de uma molécula de lactose ligada a outra de galactose, dessa forma cada GOS possui duas moléculas de galactose (n). Enquanto o rendimento da produção de GOS_t (Y) foi calculado de acordo com a equação 4, proposta por Hsu et al. (14) e a conversão de lactose calculado conforme a equação 5.

$$GOS_t = Gal_{trans} * 1.4 \quad (1)$$

$$Gal_{trans} = Gal_h - Gal_{ht} \quad (2)$$

$$k = \frac{(180 + 162.n)}{180.n} \quad (3)$$

$$Y(\%) = \frac{GOS_t}{Gal + Glic + Lac + GOS_t} * 100 \quad (4)$$

$$Convers\~ao\ de\ Lactose\ (\%) = \frac{Lac_i - Lac_r}{Lac_i} * 100 \quad (5)$$

Os dados obtidos foram tratados no software Estatística 7.0 (StatSoft®)

3.2.2.3.3. Quantificação do teor de carboidratos por cromatografia líquida de alta eficiência de troca iônica

Após a produção de GOS as amostras dos 11 experimentos foram filtradas em membrana hidrofílica PVDF de 0,22 μ m de tamanho de poro (Millipore, Billerica, MA, EUA) e analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência de troca iônica (HPAEC-PAD, modelo 5000 ICS, Dionex Canada Ltd., Oakville, Canada). Alíquotas (10 μ l) do filtrado foram automaticamente injetadas no cromatógrafo e os carboidratos foram separados em coluna analítica CarboPac® PA1 (250 mm x 4 mm; 10 μ m de tamanho de partícula; Dionex Corporation, Sunnyvale, CA, EUA) precedido por uma pré-coluna CarboPac® PA1 (50 mm x 4 mm). As corridas

cromatográficas foram realizadas a uma vazão de 1 mL/min a 25 °C, sendo que as etapas e proporções dos solventes utilizados estão detalhadas na Tabela 2. A quantificação do teor de açúcares foi feita por meio de calibrações externas a partir de soluções-padrão de galactose (1 a 40 µg/mL), glicose (0,5 a 50 µg/mL), lactose (0,5 a 150 µg/mL) e 6'-galactosil-lactose (3 a 55 µg/mL). Os padrões também foram utilizados para identificar os carboidratos com base nos seus tempos de retenção. A aquisição e tratamento dos dados foram realizados utilizando o software Chromeleon versão 6.8 (Dionex Corporation).

Tabela 2. Condições da corrida cromatográfica para a separação de açúcares.

Etapa	Solvente A* (%)	Solvente B* (%)	NaOH resultante (mmol/L)	Tempo (min)
Separação	95	5	10	0 a 60
Limpeza	0	100	200	60 a 61
	0	100	200	61 a 66
Equilíbrio/ condicionamento	95	5	10	66 a 67
	95	5	10	67 a 85

Solvente A = água ultra pura
Solvente B= NaOH 200 mmol/L

3.3. Resultados e Discussão

3.3.1. Caracterização do soro de leite

Na Tabela 3 está apresentada a composição média do soro de leite em pó utilizado neste estudo.

Tabela 3: Composição química e pH do soro de leite em pó

Componente	Composição em base seca*
pH	6,8± 0.1
Proteína (g/100g)	17.09% ± 0.36
Minerais (g/100g)	9.02% ± 0.01
Lipídeos (g/100g)	2,93% ± 0,14
Glicose (g/100g)	0.63% ± 0.07
Galactose (g/100g)	2.05% ±0.09
Lactose (g/100g)	68.28% ± 0.24

* Médias e desvios padrão

A lactose é o composto em maior quantidade no soro de leite em pó, correspondendo a 70% em base seca (MATTILA-SANDHOLM e SAARELA, 2003). A alta concentração de lactose indica que o soro de leite em pó é uma alternativa viável na utilização como substrato na produção de GOS.

3.3.2. Efeito da temperatura, pH e concentração do soro de leite (Cs)

Com base nos resultados do experimento fatorial, mostrados na Tabela 1, foram geradas equações empíricas codificadas (Eq. 6 e 7) a fim de descrever o comportamento e maximizar a produção de galactooligossacarídeos totais (GOS_t) e o rendimento de GOS_t (Y) em função das variáveis independentes temperatura, pH e concentração de soro de leite (Cs) nos níveis estudados.

$$\text{GOS}_t \text{ (g/L)} = 18.686 + 2.383T - 1.050\text{pH} + 4.281\text{Cs} + 1.921\text{TCs} - 1.246\text{pHCs} + 4.575 \quad R^2 = 0.994 \quad (6)$$

$$Y \text{ (\%)} = 9.318 + 0,620T - 0.433\text{pH} - 0.967\text{Cs} + 0.315\text{TCs} - 0.877\text{pHCs} + 2.219 \quad R^2 = 0.969 \quad (7)$$

As Tabelas 4 e 5 mostram que os modelos de regressão da produção de GOS_t e rendimento de GOS_t (Y) foram significativos ($p < 0,05$) para a análise de variância (ANOVA). A falta de ajuste para os modelos não foi significativa ($p > 0,05$), o que indica que a variação dos dados em torno da reta de regressão é devido ao erro aleatório das observações. O ajuste do modelo é também corroborado pelos valores dos coeficientes de determinação, sendo 0.994 e 0.969 para GOS_t e Y, respectivamente.

Tabela 4. ANOVA para produção de galactooligossacarídeos totais (GOS_t)

Causas de Variação	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrados Médios	F _{cal}	F _{tab}
Regressão	6	288,47	48,08	476,36	19.33
Falta de Ajuste	2	1,56	0,78	7,73	19.00
Erro Puro	2	0,20	0,10		
Total	10	290,23			

Tabela 5. ANOVA para o rendimento da produção de galactoossacarídeos totais (Y)

Causas de Variação	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrados Médios	F_{cal}	F_{tab}
Regressão	6	29,74	4,96	205,69	19.33
Falta de Ajuste	2	0,91	0,45	18,86	19.00
Erro Puro	2	0,05	0,024		
Total	10	30,70			

Ambos os modelos apresentaram significância estatística ($p < 0.05$) para os efeitos principais temperatura, pH e Cs, além das interações temperatura e Cs e pH e Cs, as quais foram mantidas no modelo. Já a interação temperatura e pH mostrou-se não significativa ($p > 0.05$), por isso foi retirada das equações 6 e 7.

Os efeitos principais da temperatura e Cs foram positivos para a produção de GOS_t e, em seus maiores níveis, aumentaram as médias das respostas em 12.75% e 10.48%, respectivamente. Para o modelo de rendimento (Y), o efeito de temperatura foi positivo e promoveu um aumento de 22.91% em relação à média.

Pode-se concluir que a temperatura influencia diretamente a produção e rendimento de GOS_t. Rodriguez-Colinas et al., (2014) observaram em seu estudo que a obtenção máxima de GOS é altamente influenciada pela temperatura.

Lisboa et al., (2012) estudaram a produção de GOS a partir da β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* (Lactozym® 3000L) em soro de leite e observaram que a produção e rendimento de GOS aumentou à medida que a temperatura se elevou de 30 para 40 °C. O mesmo comportamento foi observado por Boon; Janssen; Riet. (2000) utilizando as enzimas de *Aspergillus oryzae*, *Kluyveromyces lactis* e *Kluyveromyces fragilis* na síntese de GOS a partir de lactose. Os resultados obtidos neste trabalho em relação à temperatura mostraram-se de acordo com os relatados na literatura.

O efeito da concentração de soro (Cs) foi negativo, entretanto, nestas condições é incorporado à média o valor do coeficiente principal desta variável e a perda dos efeitos de interação temperatura e Cs e pH e Cs, ao passo, que na maior concentração de soro de leite (400 g/L) há a perda no coeficiente do efeito principal Cs e o ganho das interações, resultando numa diferença de 0,45% de ganho de rendimento no maior nível de Cs (400 g/L) em comparação com menor nível (200

g/L). Isso explica a baixa dependência da Cs no maior nível de temperatura (40 °C) e o aparecimento de duas regiões com maior resposta na superfície de contorno de pH contra concentração de soro (Figura 1E e 1F).

Estudos indicam que um dos principais fatores que afetam a reação de transgalactosilação é a concentração inicial de lactose (BOON; JANSSEN; RIET, 2000; CHO; SHIN; BUCKE, 2003; HSU; LEE; CHOU, 2007). Martinez-Villaluenga et al. (2008) determinaram a influência da concentração da lactose na produção de GOS, utilizando 40 °C, 3 U/mL de enzima *K. lactis* (Lactozym 3000 L HP G), pH 7,5 e concentração de lactose 150, 250 e 350 mg/mL e concluíram que em baixas concentrações de lactose, a transgalactosilação é inferior à hidrólise, pois a lactose é hidrolisada em glicose e galactose quando a água atua como um aceptor hidroxílico. Portanto, a água pode ser considerada um fator desfavorável para a síntese de GOS quando o foco é a transgalactosilação. Em sistemas aquosos, esta desvantagem pode ser compensada pelo aumento da concentração de lactose.

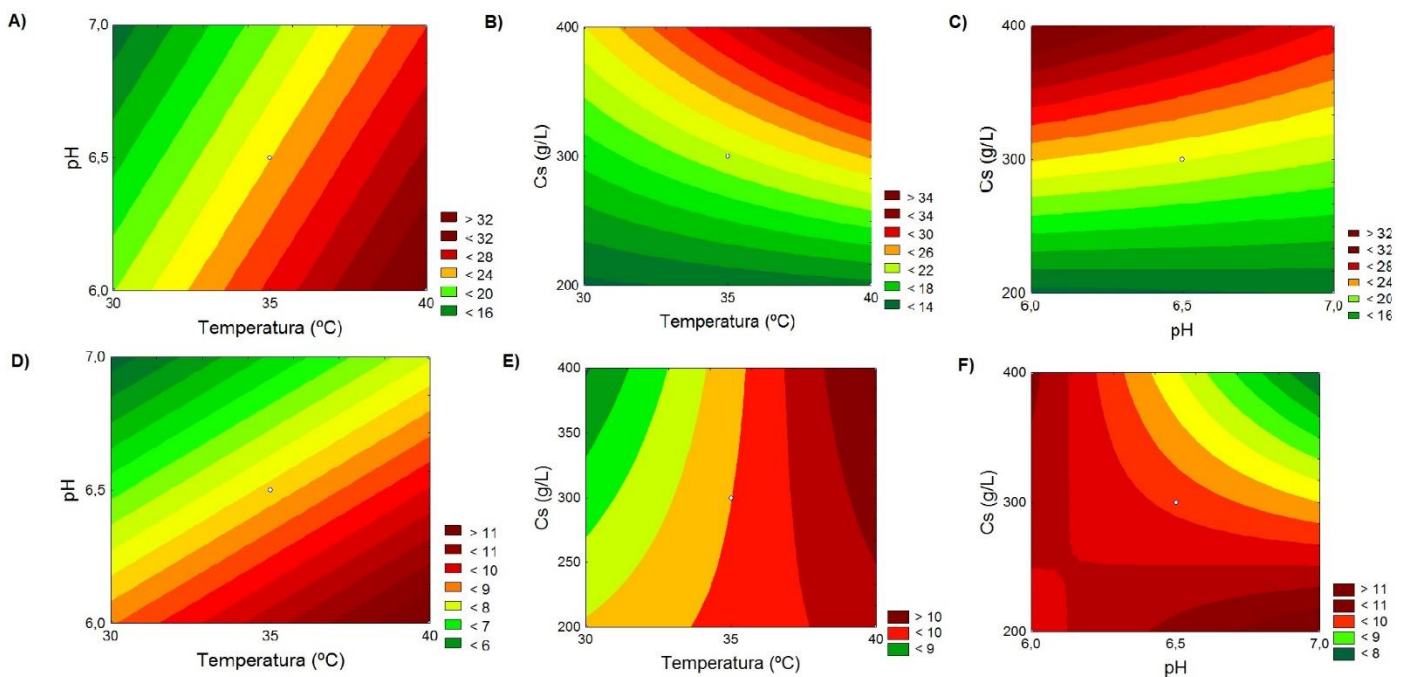
O efeito do pH foi negativo para ambos os modelos, indicando que o menor nível desta variável aumentou as médias de produção de galactooligossacarídeos totais (GOS_t) e o rendimento de GOS_t (Y) em 5.62% e 4.65%, respectivamente.

O pH ótimo para a ação da β -galactosidase na formação de GOS têm dependência direta com a origem da enzima (BOON; JANSSEN; RIET, 2000). Vários estudos, como de Adamczak; Charubin e Bednarski (2009); Pcedicová et al. (2010) e Fischer e Kleinschmidt (2015) indicam que o melhor pH na produção de GOS utilizando enzima β -galactosidase de *K. lactis* está entre 6.5 e 7.0. Resultados diferentes daqueles encontrados neste estudo.

Por meio das superfícies de contorno (Figura 1) é possível observar as dependências entre as variáveis. Para a produção de GOS_t, a temperatura mostra-se dependente do pH, uma vez que a resposta é aumentada quando o pH é diminuído em relação a uma mesma temperatura (Figura 1A). O mesmo ocorre na interação entre temperatura e pH para o rendimento de GOS_t (Y) (Figura 1D). A produção de GOS_t torna-se mais dependente da temperatura em valores mais altos de concentração de soro (Cs) e quase independente no menor nível desta variável. Entretanto, a Cs oferece alta influência na produção de GOS_t quando há a variação de seus níveis em qualquer valor de temperatura (Figura 1B). Para o rendimento (Y), a dependência da Cs em relação a temperatura é mais acentuada em valores extremos de temperatura, porém, a temperatura influencia fortemente no rendimento

(Y) em todos os níveis de Cs (Figura 1E). A interação entre pH e Cs, para a produção de GOS_t é intensificada em valores superiores de Cs, tornando-se quase independente em valores inferiores desta segunda (Figura 1C). Quanto ao rendimento (Y), é possível observar que a resposta aumenta tanto nas condições de menor nível de pH e maior de Cs assim como no maior nível de Cs e menor pH (Figura 1F). Isso ocorre devido ao ganho líquido dos efeitos que nestas condições são muito próximos.

Figura 1. Superfície de contorno GOS_t e Y, respectivamente, em função da Temperatura e pH (Cs = 400 g/L) (A,D), Temperatura e Cs (pH = 6,0) (B,E) e pH Cs (Temperatura = 40 °C).



A partir dos modelos gerados e dos perfis de desejabilidade é possível observar que as respostas são aumentadas quando a temperatura é de 40 °C, pH 6.0 e 400 g/L de concentração de soro (Cs), nessas condições são incorporadas às médias os coeficientes dos efeitos principais e das interações o que eleva a média dos experimentos de 18.686 g/L de GOS_t e 9.313% de rendimento (Y) para 29.567 g/L e 10.590%, respectivamente. Os valores observados nestas condições (Ensaio

6) são de 28.94 g/L e 10.12% os quais representam 97.88% e 95.56% dos preditos, mostrando alto ajuste dos modelos propostos.

A produção máxima de GOS varia conforme a fonte da enzima β -galactosidase. Urrutia et al. (2013) atingiram 107 g/L de GOS utilizando β -galactosidase de *A. oryzae* e 40% de lactose, valores de produção de GOS acima do encontrado neste estudo.

Estudos reforçam que a produção de GOS é dependente das condições empregadas quando utilizada a mesma fonte de enzima. Rodriguez-Colinas et al. (2011), Rodriguez-Colinas (2014) e Lisboa et al. (2012) obtiveram 11.2 g/L, 7.0 g/L e 119.8 g/L de GOS respectivamente, utilizando a mesma enzima *K. lactis* (Lactozym® 3000L) e temperatura de 40 °C mas diferindo no pH e concentração de lactose.

O rendimento de GOS é determinado pelas propriedades intrínsecas da enzima, como capacidade de transgalactosilação e de hidrólise, bem como condições utilizadas na produção de GOS (OSMAN; TZORTZIS; RASTALL, 2010). Já a concentração da enzima utilizada não afeta o rendimento de GOS e sim o tempo de reação (CHOCKCHAIWASDEE et al., 2005).

Neste trabalho o rendimento (Y) encontrado foi menor em relação aos citados pela literatura. Fischer e Kleinschmidt (2015) alcançaram 32,6% de rendimento após uma hora e meia de reação de produção de GOS utilizando *K. lactis* e 19.3g/L de soro de leite doce. Já Pcedicová et al. (2010) utilizando 20% de soro de leite em uma hora de reação obtiveram 15,5 % de rendimento. Lisboa et al. (2012) estudaram a produção de GOS utilizando β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* (Lactozym® 3000L) em 400g/L de soro de leite à 40 °C atingiram o rendimento de 29.9% em 4 horas de reação.

Frenzel et al., (2015) obtiveram, respectivamente, 41%, 21%, 13% e 11% de rendimento na produção de GOS quando trabalhou com β -galactosidase de *B. circulans*, *A. oryzae*, *A. aculeatus* e *K. lactis* em permeado de leite enriquecido com lactose (40%), demonstrando que a enzima β -galactosidase de *K. lactis* possui o menor rendimento dentre as fontes de enzima estudadas. Rendimento próximo alcançado neste trabalho.

Mateo et al. (2007) relataram que as β -galactosidasas de *Kluyveromyces* spp são inibidas por galactose e glicose. A inibição da galactose na produção de GOS é resultado de uma competição com a lactose pelo sítio ativo da β -galactosidase, uma vez que esta enzima pode formar o complexo enzima-galactosil. O mecanismo de

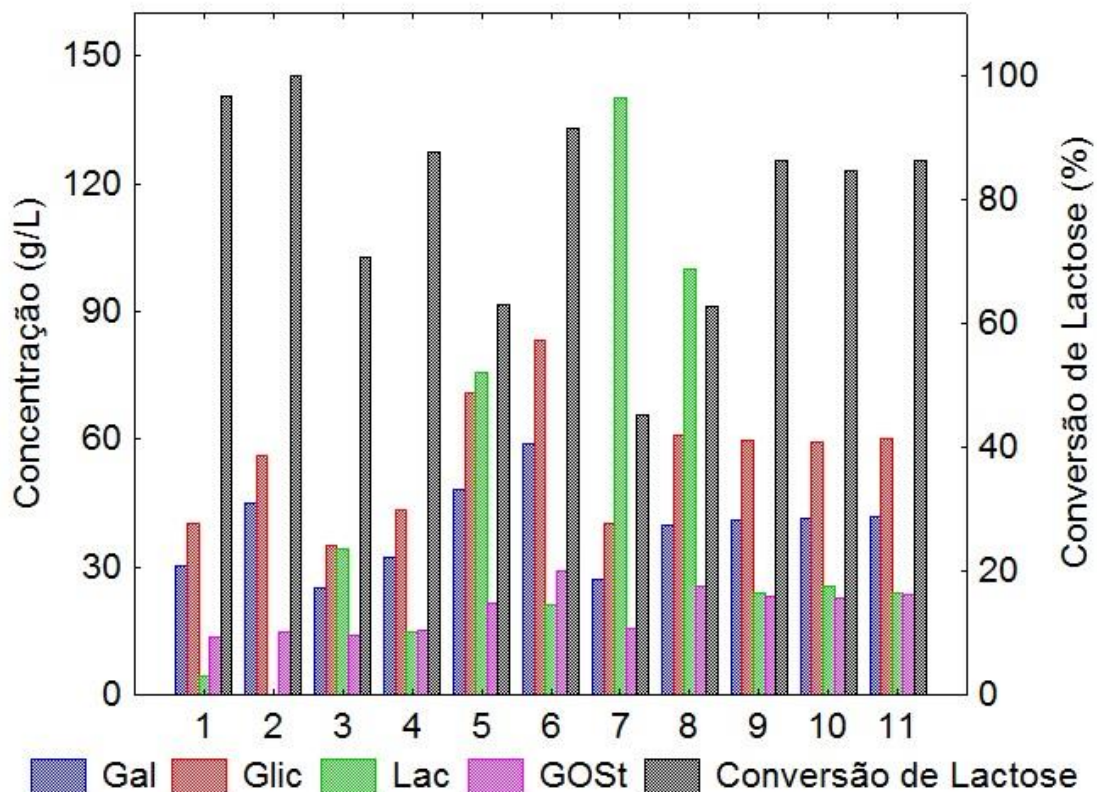
inibição pela glicose é mais complexo, e dependendo da fonte da enzima pode ser competitivo ou não competitivo (PARK e OH, 2010; GOSLING et al. 2010).

3.3.3. Síntese enzimática de GOS

Os resultados referentes à quantidade de galactose, glicose, conversão de lactose e GOS_t de cada ensaio após duas horas de reação estão apresentados na Figura 2, indicando que a composição final do meio reacional é diferenciada de acordo com as condições iniciais da reação.

É possível observar que a enzima β -galactosidase de *K. lactis* exerceu uma alta atividade de hidrólise uma vez que a porcentagem de conversão de lactose variou de 45.17% (Ensaio 7) a 100% (Ensaio 2), indicando, também, que a atividade de hidrólise foi fortemente influenciada pela variação das condições de ensaio.

Figura 2. Composição de carboidratos do soro de leite após a ação da β -galactosidase e conversão de lactose.



Uma abordagem matemática para expressar a afinidade de transgalactosilação da β -galactosidase foi utilizada por Frenzel et al. (2015) e por Huerta et al. (2011). O método baseia-se na relação entre a quantidade de GOS_t (no ponto máximo de produção) e a quantidade de lactose hidrolisada. Quanto mais próximo de 1 for o resultado, maior a afinidade de transgalactosilação da enzima. O resultado para a afinidade de transgalactosilação da enzima utilizada neste trabalho no ponto de maior produção de GOS (ensaio 6) foi de 0,129, confirmando que a enzima β -galactosidase de *K. lactis* possui maior afinidade de hidrólise.

Em todos os ensaios foram verificados maior concentração de glicose em relação à galactose, uma vez que a glicose não é utilizada na transgalactosilação para produção de GOS, já a galactose é utilizada na síntese de galactooligossacarídeos, justificando o maior acúmulo de glicose no meio.

A produção de GOS_t variou de 13.79 g/L (Ensaio 1) a 28.94 g/L (Ensaio 6), assim como o rendimento (Y) variou de 5.63% (Ensaio 7) a 11.68% (Ensaio 10). A relação entre a conversão de lactose e a produção de GOS_t influencia diretamente no rendimento de GOS_t (Equação 4).

Os resultados dos ensaios 1 a 4 possuem menores concentrações de soro de leite (Cs) e altas conversões de lactose, indicando que para favorecer a síntese de galactooligossacarídeos a concentração inicial do soro de leite deve ser maior que 20%.

O ensaio 6, apesar de não ser o de maior rendimento é o que, em valores absolutos, produziu a maior concentração de GOS_t e uma alta conversão de lactose (91.35%) o que seria interessante para a produção de um ingrediente alimentar com baixa concentração de lactose e rico em galactooligossacarídeos.

Conforme estudos já realizados, alguns fatores, como tempo de reação, concentração da enzima e fonte da enzima β -galactosidase influenciam o tipo de galactooligossacarídeos formados (ADAMCZAK; CHARUBIN; BEDNARSKI, 2009, FISCHER et al. 2015).

Martínez-Villaluenga et al (2008) concluiu em seu trabalho que aumento na concentração de enzima β -galactosidase faz prevalecer a produção de trissacarídeos. Já as investigações conduzidas por Boon; Janssen e Riet, (2000) utilizando β -galactosidase de *circulans Bacillus*, *Aspergillus oryzae*, e *Kluyveromyces fragilis* e *K. lactis* indicaram tipos e quantidades diferentes de GOS formados e que

os trissacarídeos são preferencialmente sintetizados por *Kluyveromyces* e por *A. Oryzae*.

Gosling et al (2010) verificaram que dentre os trissacarídeos sintetizados por β -galactosidase o 6'-galactosil-lactose (GOS β -1,6) foi formado em maior concentração quando comparados ao 4'-galactosil-lactose (GOS β -1,4) e 3'-galactosil-lactose (GOS β -1,3).

No presente estudo, a porcentagem de GOS β -1,6 em relação ao GOS_t sintetizado representou de 5,68% (Ensaio 2) a 18.16% (Ensaio 7). Para o ensaio 6, de maior concentração de GOS_t a forma GOS β -1,6 foi 9.10% do total de galactooligosacarídeos produzidos (Tab.1).

Sabe-se que as ligações β 1-6 de GOS são clivadas preferencialmente por bactérias lácticas e bifidobactérias (CARDELLE-COBAS et al., 2008; MARTINEZ-VILLALUENGA et al, 2008). Desta forma, a produção de GOS neste estudo pode apresentar um potencial efeito prebiótico.

3.4. Conclusão

Com base nos resultados deste trabalho, pode-se concluir que a metodologia de superfície de resposta mostrou-se eficiente para a determinação das condições de temperatura, pH e concentração de soro de leite na maximização da produção de GOS_t e rendimento. Os resultados indicaram que o soro de leite é um substrato favorável para a produção de alimentos prebióticos, também podendo ser utilizado como ingrediente de um alimento funcional e de baixo teor de lactose.

3.5. Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) e Universidade Estadual de Londrina (UEL) pelo apoio financeiro.

3.6. Referências

Adamczak, M.; Charubin, D.; & Bednarski, W. Influence of reaction medium composition on enzymatic synthesis of galactooligosaccharides and lactulose from

lactose concentrates prepared from whey permeate. *Chemical Papers* **2009**, 63,111-116.

Almeida, M. M.; Pastore, G. M. Açúcares funcionais galactooligossacarídeos. Produção de galactooligossacarídeos por β -galactosidase utilizando metodologia de superfície de resposta. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento* **2004**, 33, 10-14.

AOAC. Official Methods of Analysis of AOAC Intl. 16th ed. Methods 930.29, 930.30, 932.06, and 937.05. Association of Official Analytical Communities, Arlington, VA, USA. **2012**.

AOAC. Official Methods of Analysis of AOAC Intl. official method 2001. 02 trans-Galactooligosaccharides (TGOS),” in Selected Food Products, AOAC International, Gaithersburg, Md, USA. **2005**.

Boon, M. A.; Janssen, A. E. M.; & van't Riet, K. Effect of temperature and enzyme origin on the enzymatic synthesis of oligosaccharides. *Enzyme and Microbial Technology* **2000**, 26, 271–281.

Cardelle-Cobas, A.; Corzo, N.; Villamiel, M.; Olano, A. Isomerization of lactose-derived oligosaccharides: a case study using sodium aluminate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2008**, 56, 10954- 10959.

Cho, Y-J.; Shin, H-J.; & Bucke, C. Purification and biochemical properties of a galactooligosaccharide producing beta-galactosidase from *Bullera singularis*. *Biotechnology Letters* **2003**, 25, 2107–2111.

Chockchaisawasdee, S.; Athanasopoulos, VI; Niranjana, K.; Rastall, R. A. Synthesis of galacto-oligosaccharide from lactose using β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*: studies on batch and continuous UF membrane-fitted bioreactors. *Biotechnology and Bioengineering* **2005**, 89, 434–443.

Crittenden, R. G.; Playne, M. J. Production, properties and applications of food-grade oligosaccharides. *Trends Food Science Technology* **1996**, 7, 353–361.

Curda, L.; Rudolfová, J.; Stetina, J.; Dryák, B. Dried buttermilk containing galactooligosaccharides – process layout and its verification. *Journal of Food Engineering* **2006**, 77, 468-471.

Czermak, P.; Ebrahimi, M.; Grau, K.; Netz, S.; Sawatzki, G.; Pfromm, P. H. Membrane-assisted enzymatic production of galactosyl-oligosaccharides from lactose in a continuous process. *Journal of Membrane Science* **2004**, 232, 85–91.

Davis, L. M. G.; Martínez, I.; Walter, J.; & Hutkins, R. (2010). A dose dependent impact of prebiotic galactooligosaccharides on the intestinal microbiota of healthy adults. *International Journal of Food Microbiology* **2010**, 144, 285-292.

Fischer, C. & Kleinschmidt, T. Synthesis of galactooligosaccharides using sweet and acid whey as a substrate. *International Dairy Journal* **2015**, 48, 15-22.

Frenzel, M.; Zerge, K.; Clawin-Rädecker, I.; Lorenzen, P.C. Comparison of the galacto-oligosaccharide forming activity of different β -galactosidases. *Food Science and Technology* **2015**, 60, 1068-1071.

Ghaly, A.E.; Tango, M.S.A.; Mahmood, N.S.; Avery, A.C. Batch propagation of *Lactobacillus helveticus* for production of lactic acid from lactose concentrated cheese whey with microaeration and nutrient supplementation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **2004**, 20, 65-75.

Gosling, A.; Stevens, G. W.; Barber, A. R.; Kentish, S. E.; Gras, S. L. Recent advances refining galactooligosaccharide production from lactose. *Food Chemistry* **2010**, 121, 307–318.

Hsu, C. A., Yu, R. C., Chou, C. C. Production of β -galactosidase by Bifidobacteria as influenced by various culture conditions. *International Journal of Food Microbiology* **2005**, 104, 197–206.

Hsu, C. A.; Lee, S.L.; Chou, C.C. Enzymatic production of galactooligosaccharides by β -galactosidase from *Bifidobacterium longum* BCRC 15708. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2007**, 55, 2225-2230.

Huerta, L. M.; Vera, C.; Guerrero, C.; Wilson, L.; & Illanes, A. Synthesis of galactooligosaccharides at very high lactose concentrations with immobilised beta-galactosidases from *Aspergillus oryzae*. *Process Biochemistry* **2011**, 46, 245-252.

Inchaurredo, V. A.; Yantorno, O. M.; Voget, C. E. Yeast growth and β -galactosidase production during aerobic batch cultures in lactose-limited synthetic medium. *Process Biochemistry* **1994**, 29, 47-54.

Lisboa, C. R. Síntese enzimática de galactooligossacarídeos a partir de lactose e soro de leite. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) Universidade Federal do Rio Grande; **2008**.

Lisboa, C. R.; Martinez, L. S.; Trindade, R. A.; Costa, F. A. A.; Burkert, J. F. M.; Burkert, C. A. V. Response surface methodology applied to the enzymatic synthesis of galacto-oligosaccharides from cheese whey. *Food Science and Biotechnology* **2012**, 21, 1519-1524.

Martinez-Villaluenga, C.; Cardelle-Cobas, A.; Corzo, N.; Olano, A.; & Villamiel, M. Optimisation of conditions for galacto-oligosaccharide synthesis during lactose hydrolysis by β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. *Food Chemistry* **2008**, 107, 258-264.

Martinez-Villaluenga, C.; Cardelle-Cobas, A.; Olano, A.; Corzo, N.; Villamiel, M.; & Jimeno, M. L. Enzymatic synthesis and identification of two trisaccharides produced from lactulose by transgalactosylation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2008**, 56, 557-563.

Matella, N.J.; Dolan, K. D.; Lee, Y. S. Comparison of galactooligosaccharide production in free-enzyme ultrafiltration and in immobilized-enzyme systems. *Journal of Food Science* **2006**, 71, 363–368.

Mateo, C.; Grazu, V.; Palomo, J. M.; Lopez-Gallego, F.; Fernandez-Lafuente, R.; Guisan, J. M. Immobilization of enzymes on heterofunctional epoxy supports. *Nature Protocols* **2007**, 2, 1022–1032.

Mattila-Sandholm, T.; Saarela, M. *Functional Dairy Products*. Woodhead Publishing, England, **2003**; pp.392.

Morishita, Y.; Oowada, T.; Ozaki, A.; Mizutani, T. Galactooligosaccharide in combination with *Bifidobacterium* and *Bacteroides* affects the population of *Clostridium perfringens* in the intestine of gnotobiotic mice. *Nutrition. Res.* **2002**, 22, 1333-41.

Osman, A.; Tzortzis, G.; Rastall, R.A.; Charalampopoulos, D. A comprehensive investigation of the synthesis of prebiotic galactooligosaccharides by whole cells of *Bifidobacterium bifidum* NCIMB 41171, *Journal of Biotechnology* **2010**, 150, 140–148.

Park, A. R.; Oh, D. K. Galacto-oligosaccharide production using microbial β -galactosidase: current state and perspectives. *Appl. Microbial Biotechnology* **2010**, 85, 1279–1286.

Pocedicová, K.; Curda, L.; Misún, D.; Dryáková, A.; & Diblíková, L. Preparation of galacto-oligosaccharides using membrane reactor. *Journal of Food Engineering* **2010**, 99, 479-484.

Prazeres, A.R.; Carvalho, F.; Rivas, J.; Cheese Whey Management: a Review. *Journal of Environmental Management* **2012**, 110, 48-68.

Rodriguez-Colinas, B.; de Abreu, M. A.; Fernandez-Arrojo, L.; de Beer, R.; Poveda, A.; Jimenez-Barbero, J.; Haltrich, D.; Olmo, A. O. B.; Fernandez-Lobato, M.; Plou, F. J. Production of galacto-oligosaccharides by the β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*: Comparative analysis of permeabilised cells versus soluble enzyme. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2011**, 59, 10477–10484.

Rodriguez-Colinas, B.; Fernandez-Arrojo, L.; Ballesteros, A. O.; Plou, F. J. Galactooligosaccharides formation during enzymatic hydrolysis of lactose: Towards a prebiotic-enriched milk. *Food Chemistry* **2014**, 145, 388–394.

Scholz, E. B. Estudo cinético de *Kluyveromyces marxianus* CBS 6566 a partir de fontes alternativas de carbono e nitrogênio visando a síntese de β -galactosidase. Dissertação de mestrado em Engenharia de Processos. Universidade da Região de Joinville, SC – Brasil, **2011**.

Tomal, A. A. B.; Cunha, M. E. T.; Bosso, A.; Youssef, E. Y.; Suguimoto, H. H. Avanços tecnológicos na obtenção, purificação e identificação de galactooligosacarídeos e estudo de suas propriedades prebióticas. *UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde* **2010**, 12, 41-49.

Urrutia, P.; Rodriguez-Colinas, B.; Fernandez-Arrojo, L.; Ballesteros, A. O.; Wilson, L.; Illanes, A.; Plou, F. J. Detailed analysis of galacto-oligosaccharides synthesis with β -gal from *Aspergillus oryzae*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2013**, 61, 1081-1087.

CAPÍTULO 4 – PERFIL CINÉTICO DE GALACTOOLIGOSSACARÍDEOS PRODUZIDOS POR β -GALACTOSIDASE DE *ASPERGILLUS ORYZAE* E *KLUYVEROMYCES LACTIS*³

Resumo

O objetivo deste trabalho foi realizar um estudo cinético da produção de galactooligossacarídeos (GOS) a partir de soro de leite por β -galactosidases de *Kluyveromyces lactis* ou *Aspergillus oryzae*. Os experimentos foram conduzidos em condições otimizadas das enzimas para a produção de GOS (GOS_t) e rendimento de GOS (Y) em soro de leite e comparados com lactose pura nas mesmas condições. Os carboidratos foram quantificados por cromatografia líquida alta eficiência de troca iônica acoplado com detector de pulso amperométrico (HPEAC-PAD). Para a enzima de *A. oryzae*, não houve diferença significativa na produção de galactooligossacarídeos totais (GOS_t) ($p > 0.05$) quando se comparou a ação da enzima sobre o soro de leite e lactose pura, sendo 21.68 g/L e 21.24 g/L, respectivamente, após 120 minutos de reação. Entretanto, a enzima de *K. lactis* revelou produzir dez vezes mais GOS_t no soro de leite do que na lactose pura, sendo 34.65 g/L e 3.63 g/L, respectivamente após 120 minutos de reação. Quanto ao perfil cinético, foi observado que a enzima de *A. oryzae* em soro de leite teve a produção máxima de 26.47 g/L de GOS_t de aos 240 minutos de reação, onde 62.5% da lactose inicial é convertida em glicose, galactose e GOS. A β -galactosidase de *K. lactis* converteu 90.01% da lactose, sendo que aos 240 minutos de reação, a lactose foi completamente convertida. Esta última enzima, quando comparado com a lactose pura nas mesmas condições, converteu apenas 20% da lactose e produziu 3.87 g/L de GOS_t.

Palavras chaves: Alimento funcional, hidrólise da lactose, soro de leite, transgalactosilação

³ Situação: será submetido à LWT Food Science and Technology

Adriana Aparecida Bosso Tomal^a, Alessandra Bosso^a, Lucas Caldeirão^a, Fernando Sanches de Lima^a, Elza Louko Ida^a, Raúl Jorge Hernan Castro Gómez^a.

^a Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos; Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid, Km 380; C.P.: 6001; 86051-970; Londrina – PR, Telefone: + 55 43 3371-4080 *email: adriana_bosso@yahoo.com.br, rcastrog@yahoo.com, telefone: + 55 43 3371-4080

4.1. Introdução

Os oligossacarídeos são açúcares encontrados como componentes naturais em alguns alimentos e também podem ser sintetizados enzimaticamente (Jovanovic-Malinovska, Kuzmanova e Winkelhausen, 2015; Dwivedi et al., 2014; García-Cayuela, Díez-Municio e Herrero, 2014). Muitos destes oligossacarídeos são classificados como prebióticos, promovendo de uma forma seletiva o crescimento e/ou estimulação da atividade metabólica de bactérias benéficas à saúde proporcionando efeito positivo na composição da microbiota intestinal (Rastall e Gibson, 2014; Vitetta et al., 2014).

Entre os oligossacarídeos prebióticos, destacam-se os galactooligossacarídeos (GOS), formados por moléculas de galactose ligadas à glicose, sendo formados de tri a decassacarídeos (Li et al., 2008). Os GOS são produzidos a partir de soluções com altas concentrações de lactose por atividade de transgalactosilação, pela β -galactosidase de diversas fontes (Fai et al., 2014; Intanon et al., 2014; Michelon et al., 2014; Park e Oh, 2010).

A conversão da lactose em GOS por ação da enzima β -galactosidase é uma reação cineticamente controlada e responde a um modelo de competição entre a reação de transgalactosilação e hidrólise. No primeiro momento ocorre a formação de um complexo enzima-galactosil e a liberação da glicose, em seguida o complexo enzima-galactosil é transferido para um acceptor que contenha um grupo hidroxila. Quando a transferência é feita para a lactose ocorre a transgalactosilação e se a transferência é feita para a água, a reação é de hidrólise (Akiyama et al., 2001).

Para uma síntese efetiva de galactooligossacarídeos, além das condições ambientais como temperatura, pH e concentração do substrato, há estudos de β -galactosidases termicamente estáveis e com alta capacidade de transgalactosilação (Mahoney, 1998). A fonte preferida de β -galactosidase para aplicações biotecnológicas é a microbiana, incluindo fungos filamentosos (Fai et al., 2014; Santos, Simiqueli e Pastore, 2009), leveduras (Petrova e Kujumdzieva, 2010) e bactérias (Gosling et al., 2009); as condições ótimas do processo variam de acordo com o micro-organismo em que a enzima foi extraída (Frenzel et al., 2015; Rodriguez-Colinas et al., 2014).

Estudos têm demonstrado que β -galactosidases de fontes distintas utilizadas na produção de GOS, diferem quanto a seletividade à água, à moléculas de açúcar, ao substrato utilizado como fonte de lactose e que mesmo em concentrações iguais de lactose inicial, resultam em rendimentos de GOS, estruturas e tipos de ligações glicosídicas diferentes (Gosling et al., 2010; Otieno 2010), formando GOS com propriedades prebióticas diferentes (Depeint et al., 2008).

Os trissacarídeos são os GOS formados em maior proporção na transgalactosilação (Cardelle-Cobas et al., 2008; Martinez-Villaluenga et al., 2008), mas diferem quanto à ligação glicosídica. β -galactosidases de *A. oryzae* e *K. lactis* produzem preferencialmente GOS com ligações glicosídicas β 1-6, formando 6'-galactosil-lactose como produto principal (Gosling et al., 2010), enquanto β -galactosidase de *B. circulans* produz predominantemente GOS com ligações glicosídicas β 1-4 formando principalmente 4'-galactosil-lactose (Rodriguez-Colinas et al., 2012). A β -galactosidase de *K. lactis* difere de *A. oryzae* quanto a composição geral de GOS, formando oligossacarídeos de maior peso molecular e dissacarídeos diferentes da lactose, além do trissacarídeo 6'-galactosil-lactose (Martinez-Villaluenga et al., 2008; Urrutia et al., 2013).

Neste trabalho, foi realizado um estudo cinético da produção de GOS a partir do soro de leite utilizando enzima β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* e *Aspergillus oryzae*, com o objetivo de desenvolver uma estratégia para a obtenção de produtos lácteos com uma quantidade significativa de GOS e, ao mesmo tempo, com baixo teor de lactose.

4.2. Material e Métodos

4.2.1. Materiais

O soro de leite em pó integral foi utilizado como matéria prima e adquirido da empresa Confepar® (Londrina, Brasil) e armazenado à temperatura de 4 °C até seu uso.

As enzimas utilizadas foram β -galactosidases comerciais de *Aspergillus oryzae* Pharmanostra 5000 U/g (BIO-CAT®, Estados Unidos) e *Kluyveromyces lactis* maxilact® LX 5000 (DSM FOOD SPECIALITIES), armazenada a 4 °C até a utilização.

Os reagentes utilizados foram de grau analítico. Os carboidratos utilizados como padrões foram lactose (β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 4)-D-glicose) Sigma, glicose (D(+)-Glicose) Sigma, galactose (D(+)-Galactose) Sigma e 6'-galactosil-lactose (GOS β -1,6), Carbosynth (Berkshire, UK), de grau cromatográfico.

4.2.2. Métodos

4.2.2.1.1. Caracterização química do soro

Retirou-se uma amostra representativa do soro de leite em pó para realizar sua caracterização. A análise de proteínas foi realizada pelo método de Kjeldahl. O fator de conversão utilizado foi de 6,38. O perfil de minerais foi determinado em Espectrofotômetro de Emissão Atômica (ICP). A determinação de cinzas totais foi realizada pelo método de mufla 500-550°C. O pH foi determinado por potenciômetro digital (Hanna Instruments - modelo HI3221). O teor de lipídeos foi quantificado por soxhlet com hidrólise ácida. As análises foram realizadas em triplicata segundo metodologia descrita pela AOAC (2012).

Os carboidratos glicose, galactose e lactose foram determinados por HPAEC-PAD (high performance anion exchange chromatography).

4.2.2.2. Formação de galactooligossacarídeos a partir do soro de leite

As reações de síntese enzimática de GOS com a enzima β -galactosidase de *K. lactis* e *A. oryzae* foram realizadas em meio aquoso. As condições de incubação foram definidas de acordo com os resultados anteriores não apresentados. O sistema reacional utilizando β -galactosidase de *A. oryzae* (15 U/mL) foi composto por 400 g/L de soro de leite integral reidratado em tampão citrato-fosfato 0,1 M a pH 4.5. Para β -galactosidase de *K. lactis* (15 U/mL) o sistema foi composto por 400 g/L de soro de leite integral reidratado em tampão fosfato de sódio 0,1M a pH 6.0.

Os frascos foram dispostos em incubadora rotatória orbital (Tecnal, modelo TE- 421) sob agitação de 180 rpm, temperatura de 45 °C para *A. oryzae* e 40 °C para *K. lactis*. O volume total utilizado foi de 100 mL, acondicionados em

erlenmeyers de 250 mL de capacidade. Alíquotas de 5 mL foram coletadas a cada meia hora até duas horas de reação e após as alíquotas foram retiradas a cada uma hora até totalizar 6 horas de reação, em seguida foram inativadas em banho-maria a uma temperatura de 100°C por 5 min e posteriormente congeladas até a quantificação dos açúcares por HPAEC-PAD.

A síntese de GOS foi avaliada pelos parâmetros: produção de GOS total (GOS_t), rendimento de GOS_t (Y), conversão de lactose, glicose e galactose livres.

A produção de GOS total foi calculada de acordo com a equação 1, adaptada da AOAC 2001.02 (AOAC, 2005), onde foi admitida que a galactose transgalactosilada (Gal_{trans}) é a diferença entre a galactose hidrolisada (Gal_h) e a galactose hidrolisada teórica (Gal_{ht}), onde a Gal_{ht} corresponde a glicose total liberada nos ensaios (equação 2). O fator de correção k (equação 3) indica a relação de quantas moléculas de galactoses liberadas são necessárias para formar uma molécula de GOS. Com base estequiométrica foi admitido que um GOS é formado a partir de uma molécula de lactose ligada a outra de galactose, dessa forma cada GOS possui duas moléculas de galactose (n). Enquanto o rendimento da produção de GOS_t (Y) foi calculado de acordo com a equação 4, proposta por Hsu, Yu e Chou (2005) e a conversão de lactose calculado conforme a equação 5.

$$GOS_t = Gal_{trans} * 1.4 \quad (1)$$

$$Gal_{trans} = Gal_h - Gal_{ht} \quad (2)$$

$$k = \frac{(180 + 162.n)}{180.n} \quad (3)$$

$$Y(\%) = \frac{GOS_t}{Gal + Glic + Lac + GOS_t} * 100 \quad (4)$$

$$Conversão\ de\ Lactose\ (\%) = \frac{Lac_i - Lac_r}{Lac_i} * 100 \quad (5)$$

$$Produtividade = \frac{GOS_t}{t} \quad (6)$$

4.2.2.3. Análise estatística

Foi realizado teste-t de Student nas comparações entre os parâmetros da produção de galactooligossacarídeos (GOS) sintetizados a partir dos substratos soro

de leite ou lactose pura para as enzimas originadas de *Aspergillus oryzae* ou *Kluyveromyces lactis*, considerando $p < 0,05$ para significância estatística.

Os dados obtidos foram tratados no software Estatística 7.0 (StatSoft®).

4.2.2.4. Quantificação dos carboidratos (HPAEC-PAD)

As amostras obtidas foram filtradas em membrana hidrofílica PVDF de 0,22 μm de tamanho de poro (Millipore, Billerica, MA, EUA) e analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência de troca iônica (HPAEC-PAD, modelo 5000 ICS, Dionex Canada Ltd., Oakville, Canada). Alíquotas (10 μl) do filtrado foram automaticamente injetadas no sistema cromatográfico e os carboidratos foram separados pela coluna analítica CarboPac® PA1 (250 mm x 4 mm; 10 μm de tamanho de partícula; Dionex Corporation, Sunnyvale, CA, EUA) precedido por uma pré-coluna CarboPac® PA1 (50 mm x 4 mm). As corridas cromatográficas foram realizadas a uma vazão de 1 mL/min a 25 °C, sendo que as etapas e proporções dos solventes estão detalhadas na Tabela 1. A quantificação dos açúcares foi feita por meio de calibrações externas a partir de soluções-padrão de galactose (1 a 40 $\mu\text{g/mL}$), glicose (0,5 a 50 $\mu\text{g/mL}$), lactose (0,5 a 150 $\mu\text{g/mL}$) e 6'-galactosil-lactose (3 a 55 $\mu\text{g/mL}$). Os padrões também foram utilizados para identificar os carboidratos com base nos seus tempos de retenção. A aquisição e tratamento dos dados foram realizados utilizando o software Chromeleon versão 6.8 (Dionex Corporation).

Tabela 1. Condições da corrida cromatográfica para a separação de açúcares.

Etapa	Solvente A* (%)	Solvente B* (%)	NaOH resultante (mmol/L)	Tempo (min)
Separação	95	5	10	0 a 60
Limpeza	0	100	200	60 a 61
	0	100	200	61 a 66
Equilíbrio/	95	5	10	66 a 67
condicionamento	95	5	10	67 a 85

Solvente A = água ultrapura

Solvente B = NaOH 200 mmol/L

4.3. Resultados e Discussão

4.3.1. Caracterização do soro de leite em pó

A lactose é o componente em maior quantidade no soro de leite em pó (Tabela 2), correspondendo aproximadamente 70% em base seca (David et al, 2010). A alta concentração de lactose indica que o soro de leite em pó é uma alternativa viável na utilização como substrato na produção de GOS.

A caracterização do teor de minerais no soro de leite é importante devido a atuação como ativadores ou inibidores enzimáticos, influenciando na produção e rendimento de GOS. Chen, Hsu e Chiang (2002) relataram que os cátions Mg^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} e Na^{+} podem ativar ou inibir a enzima, dependendo da sua origem.

Tabela 2: Caracterização química do soro de leite em pó

Componente	Composição em base seca*
pH	6,8 ± 0.1
Proteína (g/100g)	17.0 ± 0.36
Minerais (g/100g)	9.02 ± 0.01
Lipídeos (g/100g)	2.93 ± 0,14
Glicose (g/100g)	0.63 ± 0.07
Galactose (g/100g)	2.05 ± 0.09
Lactose (g/100g)	68.28 ± 0.24
K^{+} (mg/100g)	1918.5 ± 0,21
Ca^{2+} (mg/100g)	731.98 ± 0.22
Mg^{2+} (mg/100g)	125.19 ± 0.16
Fe^{2+} (mg/Kg)	5.81 ± 0.11
Mn^{2+} (mg/Kg)	0.19 ± 0.07
Zn^{2+} (mg/Kg)	3.01 ± 0.14
Cu^{2+} (mg/Kg)	1.59 ± 0.16
Al^{3+} (mg/Kg)	11.27 ± 0.11
Fósforo (mg/100g)	785.06 ± 0.22
Enxofre (mg/100g)	196.91 ± 0.15
Boro (mg/Kg)	5.52 ± 0.11
Cromo (mg/Kg)	0.40 ± 0.15
Molibdênio (mg/Kg)	0.37 ± 0.07
Níquel (mg/Kg)	0.43 ± 0.12

* Médias e desvios padrão

4.3.2. Comparação da produção de GOS a partir de soro de leite ou lactose

Foi realizado um estudo comparativo afim de investigar a influência da composição dos substratos soro de leite e lactose PA na produção de GOS.

Foi utilizado 400g/L de soro de leite contendo 68,28% de lactose (Tabela 2) e a mesma proporção deste carboidrato foi utilizada na produção de GOS por lactose pura. A reação ocorreu por 120 minutos em pH 4.5 e temperatura igual a 45 °C para enzima originada de *A. oryzae* e em pH 6.0 e temperatura de 40 °C para *K. lactis*. As condições de síntese de GOS_t utilizadas neste trabalho foram previamente estudadas pelos autores.

Os parâmetros avaliados na comparação da utilização de soro de leite e lactose pura foram, produção de GOS_t, conversão da lactose, rendimento (Y) e produtividade da síntese de galactooligossacarídeos (Tab. 3).

Tabela 3. Comparação da utilização de soro de leite e lactose pura sobre a produção de GOS_t, conversão de lactose, rendimento (Y) e produtividade da síntese de galactooligossacarídeos totais de β-galactosidases de *Aspergillus oryzae* ou *Kluyveromyces lactis*.

Fonte da enzima	Substrato	GOS _t (g/L)	Conversão de lactose (%)	Y (%)	Produtividade (g/L/h)
<i>A. oryzae</i>	Soro de leite	21.68 ± 3.57 ^a	62.11 ± 2.94 ^b	7.05 ± 1.19 ^a	0.180 ± 0.015 ^a
	Lactose Pura	21.24 ± 2.14 ^a	68.93 ± 2.09 ^a	8.74 ± 0.80 ^a	0.085 ± 0.009 ^b
<i>K. lactis</i>	Soro de Leite	34.65 ± 1.75 ^a	90.10 ± 1.24 ^a	14.04 ± 0.62 ^a	0.288 ± 0.047 ^a
	Lactose Pura	3.63 ± 0.11 ^b	19.49 ± 0.99 ^b	1.77 ± 0.05 ^b	0.030 ± 0.002 ^b

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística para teste-t (p<0.05).

Foi possível observar que a produção de GOS_t e o rendimento da produção de GOS_t (Y) não apresentou diferença estatística para o teste-t (p>0.05) entre os diferentes substratos para β-galactosidase de *A. oryzae*. Este resultado indica que esta enzima não é dependente dos íons presente no soro e que a quantidade destes minerais não ativaram e nem inibiram a atividade enzimática para produção de GOS_t.

Entretanto, a conversão de lactose foi maior para a lactose pura do que para a o soro de leite, este resultado pode estar envolvido com a maior disponibilidade de encontro entre enzima e lactose, uma vez que o soro de leite é uma matriz mais complexa que a solução de lactose. A relação entre alta conversão de lactose e a

baixa concentração de GOS_t quando utilizado lactose pura indica que a enzima apresentou maior atividade hidrolítica do que de transgalactosilação.

Quando comparada a produção de GOS_t a partir da β -galactosidase de *K. lactis*, foi observado uma diferença estatística para o teste-t ($p > 0.05$), ressaltando que a produção de GOS_t foi inferior quando se utilizou lactose pura como substrato. Essa redução é observada também em todos os outros parâmetros estudados. A dependência da enzima β -galactosidase de *K. lactis* frente os minerais presentes no soro de leite é evidenciada pelos resultados obtidos.

Os resultados deste trabalho corroboram com os estudos de Fischer e Kleinschmidt (2015) que analisaram a influência dos íons Na⁺, K⁺, NH₄⁺, Mg²⁺ e Ca²⁺ na atividade da enzima β -galactosidase de *A. oryzae* e os resultados indicaram que os íons testados não afetaram a atividade da enzima, mostrando que a mesma não possui dependência dos íons presentes no meio, o que torna o soro de leite uma alternativa viável para produção de GOS_t. Já para a enzima *K. lactis* os autores relataram que a atividade da enzima β -galactosidase é fortemente ativada na presença de Na⁺, NH₄⁺ e K⁺.

4.3.3. Perfil cinético da produção de GOS_t

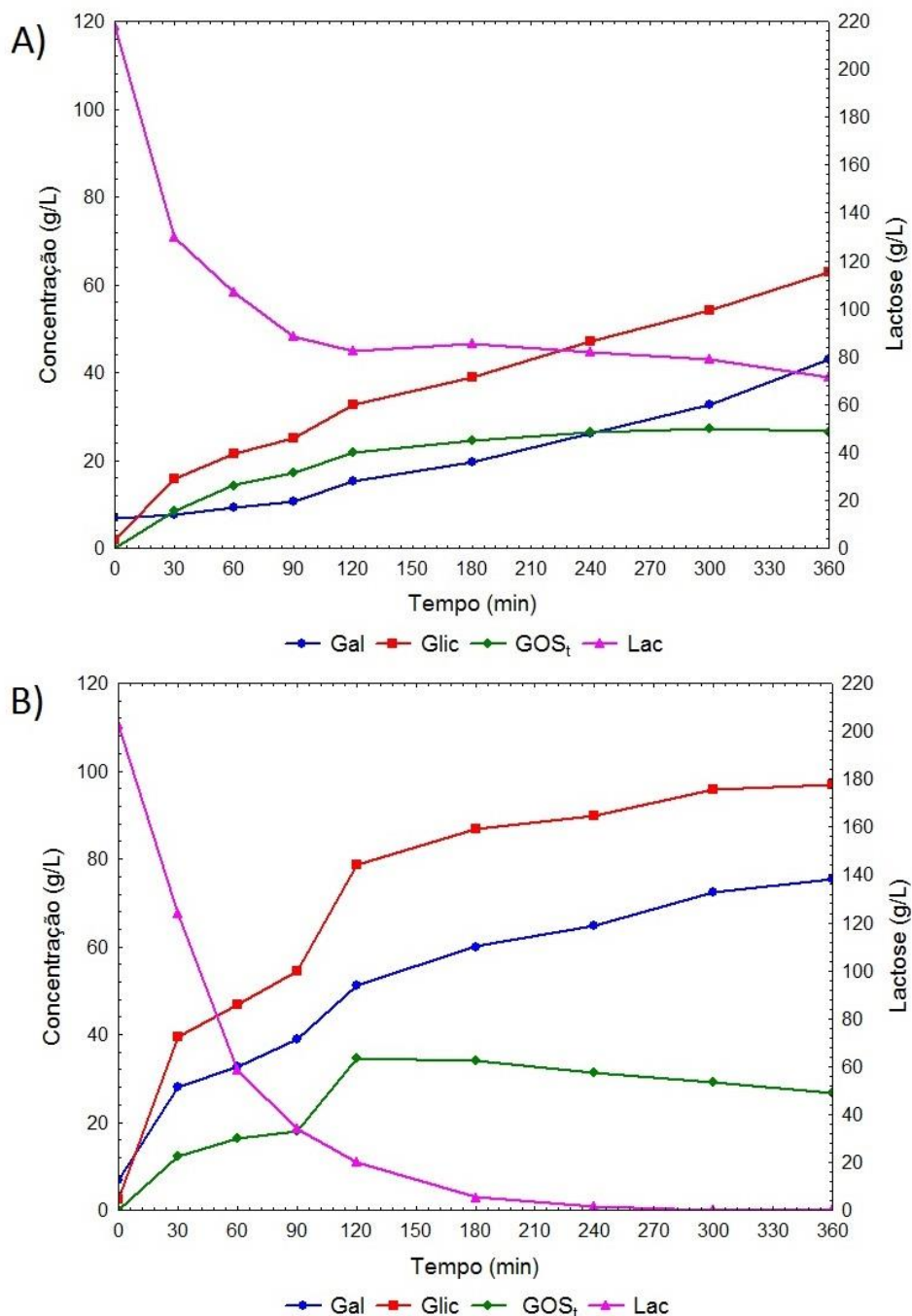
As mesmas condições reacionais utilizadas no estudo de comparação entre os substratos foram utilizadas no estudo da cinética.

A Figura 1 mostra a cinética da síntese de GOS_t para as enzimas *A. oryzae* (A) e *K. lactis* (B) tendo o soro de leite como substrato.

Para a enzima de *A. oryzae*, a produção de GOS_t atingiu o seu máximo em 240 minutos de reação, após este período a concentração permaneceu constante até os 360 minutos. A hidrólise da lactose foi mais acentuada nos primeiros 90 minutos, tornando-se mais lenta após este tempo. O aumento das concentrações de galactose e glicose permaneceram praticamente em taxa constante durante os 360 minutos de reação.

Para β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis*, a máxima produção de GOS_t foi após 120 minutos de reação, levando a uma redução na concentração de GOS imediatamente após este tempo. Este fato se dá pela hidrólise do próprio GOS formado devido a especificidade da enzima e a diminuição da lactose no meio reacional. A concentração de lactose foi completamente hidrolisada após 240 minutos de reação.

Figura 1. Concentração de glicose, galactose, lactose e GOS_t em função do tempo de reação para β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* (A) e *Kluyveromyces lactis* (B).

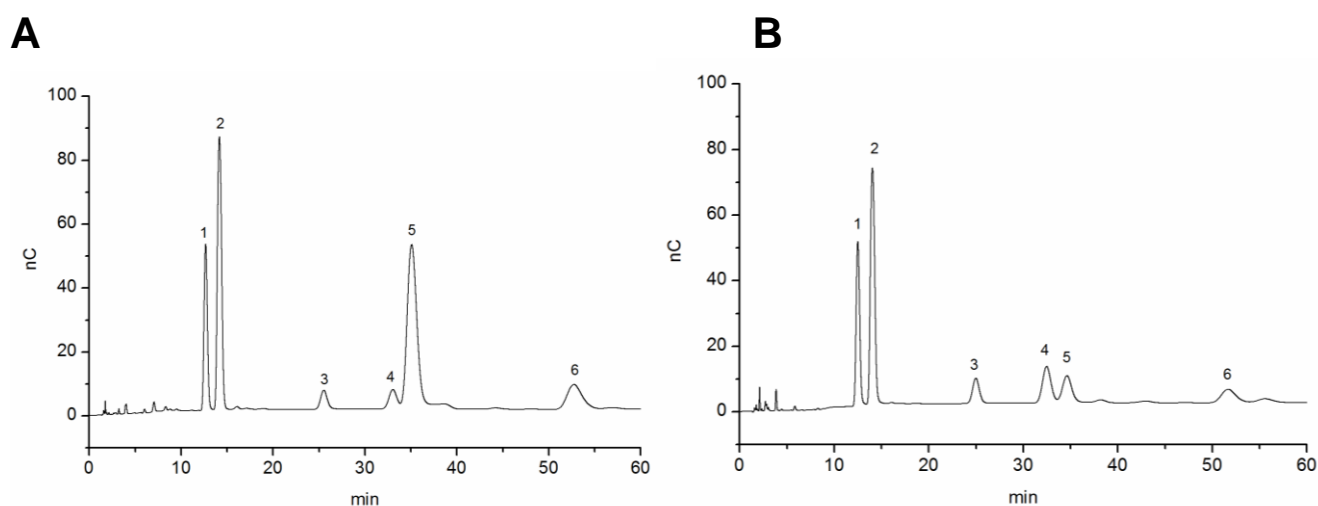


Hsu, Lee e Chou (2007) relataram que o acúmulo de glicose e galactose no meio reacional atuam como inibidores de diferentes fontes de β -galactosidases. Cruz et al. (1999) apresentaram que a síntese de oligossacarídeos por β -galactosidase de *Penicillium simplicissimum* foi fortemente inibida quando os monossacarídeos

atingiram concentrações próximas a de GOS (cerca de 180 g/L). Mateo et al. (2007) relataram que as β -galactosidasas de *Kluyveromyces* spp são inibidas por galactose (inibição competitiva) e glicose (inibição não competitiva). Os monossacarídeos glicose e principalmente galactose são reconhecidos como inibidores da reação de transgalactosilação. A inibição da galactose é resultado de uma competição com a lactose pelo sítio ativo da β -galactosidase, uma vez que esta enzima pode formar o complexo enzima-galactosil. O mecanismo de inibição pela glicose é mais complexo, e dependendo da fonte da enzima pode ser competitivo ou não competitivo (Gosling et al., 2010; Park e Oh, 2010).

A Figura. 2 mostra os cromatogramas por HPAEC-PAD da reação do soro de leite com a enzima β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* e *Kluyveromyces lactis* no ponto de máxima concentração de GOS. Os picos 1, 2, 5 e 6 correspondem a galactose, glicose, lactose e 6'-galactosil-lactose (GOS β -1,6), respectivamente.

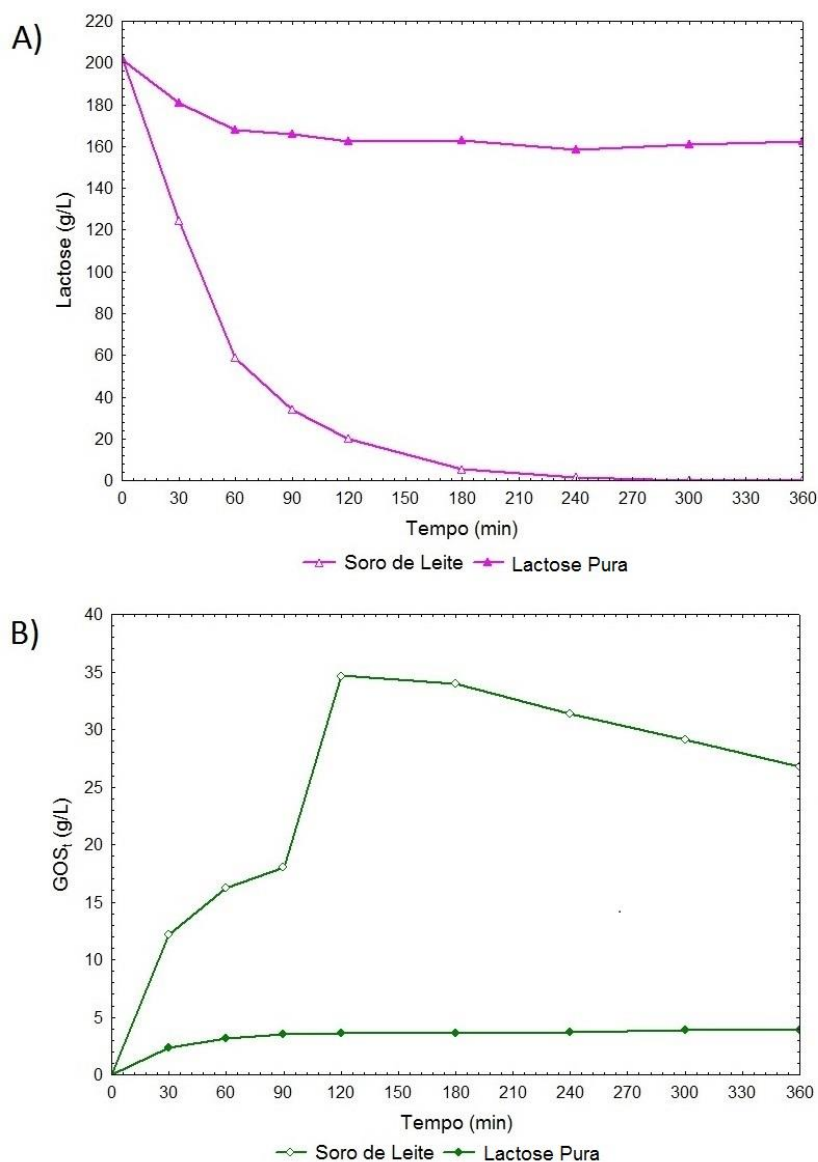
Figura 2. Cromatogramas por HPAEC-PAD da reação do soro de leite com a enzima β -galactosidase de (A) *Aspergillus oryzae* (15U/mL), 400 g/L de soro de leite, 40 °C e pH 4,5 e (B) *Kluyveromyces lactis* (15U/mL), 400 g/L de soro de leite, 45 °C e pH 6,0. Os picos correspondem a: (1) Galactose, (2) Glicose, (5) lactose e (6) 6'-galactosil-lactose.



4.3.4. Comparação cinética utilizando substratos soro de leite e lactose pura por *K. Lactis*

Baseado nos resultados da Tabela 3 onde a produção de GOS_t por *K. lactis* utilizando soro de leite foi superior à lactose pura, foi realizado o estudo comparativo entre as duas fontes.

Figura 3. Comparação do consumo de lactose (A) e produção de galactooligossacarídeos totais (B) da ação de β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* sobre os substratos soro de leite e lactose pura.



Quando comparado o perfil cinético da ação da enzima *K. lactis* sobre o soro de leite e a lactose pura (Fig 3A), foi possível observar que a máxima hidrólise da lactose foi após 120 minutos de reação para a lactose pura, convertendo apenas 19.59% da lactose inicial, permanecendo constante até os 360 min de reação. Entretanto, para o mesmo tempo de hidrólise de lactose no soro de leite foi de 90.10%, chegando a 99% de conversão após 240 minutos.

A produção de GOS_t (Fig 3B) permaneceu constante após 60 minutos de reação, aproximadamente 3 g/L de GOS_t, quando se utilizou a lactose pura como substrato, contudo, quando se utilizou soro de leite, a maior produção foi em 120 minutos de reação, chegando a 34.65 g/L de GOS_t. Este resultado, como já discutido, é devido a alta dependência de minerais que atuam como cofatores enzimáticos de *K. lactis*, os quais estão presentes no soro de leite mas ausentes na solução de lactose pura.

4.4. Conclusão

A β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* demonstrou ter alta atividade hidrolítica além de ter a maior produção de galactooligossacarídeos totais quando comparado com a enzima de *Aspergillus oryzae* tendo soro de leite como substrato. A enzima de *A. oryzae* demonstrou ter o mesmo comportamento, independente do substrato ser mais complexo, como o soro de leite ou mais simples como a solução de lactose pura, porém a enzima de *K. lactis* demonstrou ter maior atividade de transgalactosilação no soro de leite quando comparado a lactose pura.

O produto obtido da produção de GOS a partir do soro de leite com enzima β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* mostrou ser uma alternativa de ingrediente em alimentos funcionais com quantidade significativa de GOS e baixo teor de lactose.

4.5. Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) e Universidade Estadual de Londrina (UEL) pelo apoio financeiro.

4.6. Referências

Akiyama, K., Takase, M., Horikoshi, K., Shigeo, O. (2001). Production of galactooligosaccharides from lactose using a β -glucosidase from *Thermus* sp. Z-1. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 65, 438-441.

AOAC. (2005). Official Methods of Analysis of AOAC Intl. official method 2001. 02 trans-Galactooligosaccharides (TGOS),” in Selected Food Products, AOAC International, Gaithersburg, Md, USA.

AOAC. (2012). Association of official analytical chemists. Official methods of analysis of the AOAC International. 19 ed. Arlington.

Cardelle-Cobas, A., Corzo, N., Villamiel, M., Olano A. (2008). Isomerization of lactose-derived oligosaccharides: a case study using sodium aluminate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 10954-10959.

Chen, C. S., Hsu, C. K., Chiang, B. H. (2002). Optimization of the enzymic process for manufacturing low-lactose milk containing oligosaccharides. *Process Biochemistry*, 38, 801-808.

Cruz, R., Cruz, V. A., Belote, J.G., Khenayfes, M. O., Dorta, C., Oliveira, L. H. S., Ardiles, E., e Galli, A. (1999). Production of trans-galactosylated oligosaccharides (TOS) by galactosyltransferase activity from *Penicillium simplicissimum*. *Bioresource Technology*, 70, 165-171.

David, F. M., Collao-Saenz, E. A., Pérez, J. R. O., Castro, A.L.A., Resende, H. R. A., Landim, A.V. (2010). Efeito da adição de soro de leite sobre a digestibilidade aparente e os parâmetros sanguíneos de vacas secas. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 62, 1183-1190.

Depeint, F., Tzortzis, G., Vulevic, J., l'Anson, K., & Gibson, G. R. (2008). Prebiotic evaluation of a novel galactooligosaccharide mixture produced by the enzymatic activity of *Bifidobacterium bifidum* NCIMB 41171, in healthy humans: a randomized, double-blind, crossover, placebo-controlled intervention study. *American Journal of Clinical Nutrition*, 87, 785-791.

Dwivedi, S., Sahrawat, K., Puppala, N., Ortiz, R. (2014). Plant prebiotics and human health: Biotechnology to breed prebiotic-rich nutritious food crops. *Electronic Journal of Biotechnology*, 17, 238–245.

Fai, A. E. C., Silva, J. B., Andrade, C. J.; Bution, M.L.; Pastore, G.M. (2014). Production of prebiotic galactooligosaccharides from lactose by *Pseudozyma tsukubaensis* and *Pichia kluyveri*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 03, 343-350.

Fischer, C., Kleinschmidt, T. (2015). Synthesis of galactooligosaccharides using sweet and acid whey as a substrate. *International Dairy Journal*, 48, 15-22.

Frenzel, M., Zerge, K., Clawin-Radecker, I., Lorenzen, P. C. (2015). Comparison of the galactooligosaccharide forming activity of different β -galactosidases. *LWT- Food Science and Technology*, 60, 1068-1071.

García-Cayuela, T., Díez-Municio, M., Herrero, M. (2014). Selective fermentation of potential prebiotic lactosederived oligosaccharides by probiotic bacteria, *International Dairy Journal*, 38, 11-15.

Gosling, A., Alftrén, J., Stevens, G. W., Barber, A. R.,; Kentish, S.E., Gras, S.L. (2009). Facile pretreatment of *Bacillus circulans* β -Galactosidase increases the yield of galactosyl oligosaccharides in milk and lactose reaction systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 3366-3372.

Gosling, A., Stevens, G. W., Barber, A. R., Kentish, S. E., Gras, S. L. (2010). Recent advances refining galacto-oligosaccharide production from lactose. *Food Chemistry*, 121, 307- 318.

Hsu, C. A., Lee, S. L., Chou, C. C. (2007). Enzymatic production of galactooligosaccharides by beta-galactosidase from *Bifidobacterium longum* BCRC 15708. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 2225–2230.

Hsu, C. A., Yu, R. C., Chou, C. C. (2005). Production of β -galactosidase by *Bifidobacteria* as influenced by various culture conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 104, 197-206.

Intanon, M., Arreola, S.L., Pham, N. H., Kneifel, W., Haltrich, D., Nguyen, T. H. (2014). Nature and biosynthesis of galacto-oligosaccharides related to oligosaccharides in human breast milk. *FEMS Microbiology Letters*, 353, 89-97.

Jovanovic-Malinovska, R., Kuzmanova, S., Winkelhausen, E. (2015). Application of ultrasound for enhanced extraction of prebiotic oligosaccharides from selected fruits and vegetables. *Ultrasonics Sonochemistry*, 22, 446-453.

Li, Z. Y, Xiao, M., Lu, L. L., Li, Y. M. (2008). Production of non-monosaccharide and high-purity galactooligosaccharides by immobilized enzyme catalysis and fermentation with immobilized yeast cells. *Process Biochemistry*, 43, 896–899.

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

Martinez-Villaluenga, C., Cardelle-Cobas, A., Corzo, N., Olano, A. (2008). Study of galactooligosaccharide composition in commercial fermented milks. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21,540-544.

Mateo, C., Grazu, V., Palomo, J. M., Lopez-Gallego, F., Fernandez-Lafuente, R., Guisan, J. M. (2007). Immobilization of enzymes on heterofunctional epoxy supports. *Nature Protocols*, 2, 1022–1032.

Michelon, M., Manera, A. P., Carvalho, A. L., e Filho, F. (2014). Concentration and purification of galacto-oligosaccharides using nanofiltration membranes. *Journal of Food Science and Technology*, 49, 1953-1961.

Otieno, D. O., (2010). Synthesis of β -galactooligosaccharides from lactose using microbial β -galactosidases. *Compr Rev Food Sci Food Saf.*, 9, 471-482.

Park, A. R., Oh, D. K. (2010). Galacto-oligosaccharide production using microbial β -galactosidase: Current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85, 1279–1286.

Petrova, V.Y., Kujumdzieva, A.V. (2010). Thermotolerant yeast strains producers of galactooligosaccharides. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 24, 1612-1619.

Rastall, R. A., Gibson, G.R. (2014). Recent developments in prebiotics to selectively impact beneficial microbes and promote intestinal health. *Current Opinion in Biotechnology*, 32, 42-46.

Rodriguez-Colinas, B., Poveda, A., Jimenez-Barbero, J., Ballesteros, A. O., Plou, F. J. (2012). Galacto-oligosaccharide synthesis from lactose solution or skim milk using the β -galactosidase from *Bacillus circulans*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 6391- 6398.

Rodriguez-Colinas, B.; Fernandez-Arrojo, L.; Ballesteros, A. O.; Plou, F. J. (2014). Galactooligosaccharides formation during enzymatic hydrolysis of lactose: Towards a prebiotic-enriched milk, *Food Chemistry*, 145, 388–394.

Santos, R., Simiqueli, A. P. R., Pastore, G. M. (2009). Produção de galactooligossacarídeo por *Scopulariopsis* sp. *Ciência e Tecnologia de alimentos*, 29, 682-689.

Urrutia, P., Rodriguez-Colinas, B., Fernandez-Arrojo, L., Ballesteros, A. O., Wilson, L., Illanes, A., Plou, F. J. (2013). Detailed analysis of galacto-oligosaccharides synthesis with b-gal from *Aspergillus oryzae*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 1081-1087.

Vitetta, L., Briskey, D., Alford, H., Hall, S., Coulson, S. (2014). Probiotics, prebiotics and the gastrointestinal tract in health and disease. *Inflammopharmacol*, 22, 135–154.

CONCLUSÃO GERAL

Com base nos resultados deste trabalho, pode-se concluir que a metodologia de superfície de resposta mostrou-se eficiente para o melhoramento das condições de temperatura, pH e concentração de soro de leite para a maximização da produção de GOS_t e rendimento da produção de GOS_t para as enzimas originadas de *Aspergillus oryzae* e *Kluyveromyces lactis*.

A β -galactosidase de *K. lactis* demonstrou ter alta atividade hidrolítica além de ter a maior produção de galactooligossacarídeos totais quando comparado com a enzima de *Aspergillus oryzae* tendo soro de leite como substrato. A enzima de *A. oryzae* demonstrou ter o comportamento semelhante, independente do substrato ser mais complexo, como o soro de leite ou mais simples como a solução de lactose pura. Entretanto, enzima de *K. lactis* demonstrou ter maior atividade de transgalactosilação no soro de leite quando comparado a lactose pura.

O produto obtido da produção de GOS a partir do soro de leite com enzima β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* mostrou ser uma alternativa de ingrediente em alimentos funcionais com quantidade significativa de GOS e baixo teor de lactose.