



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

SÍNTESE ENZIMÁTICA DE GALACTOOLIGOSSACARÍDEOS A PARTIR DE
LACTOSE E SORO DE LEITE

CRISTIANE REINALDO LISBOA

Prof. Dr. Carlos André Veiga Burkert
Orientador

RIO GRANDE, RS
2008



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

SÍNTESE ENZIMÁTICA DE GALACTOOLIGOSSACARÍDEOS A PARTIR DE
LACTOSE E SORO DE LEITE

Eng^a. Cristiane Reinaldo Lisboa

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

Prof. Dr. Carlos André Veiga Burkert

Orientador

Prof^a. Dr^a. Janaína F. de Medeiros Burkert

Co-orientadora

RIO GRANDE, RS
2008

***“Aprendi com a primavera a deixar-me
cortar e voltar sempre inteira”***

(Cecília Meireles)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus que me deu forças para seguir em frente e que sempre me acompanha em todos os momentos da minha vida.

Aos meus amados pais Getúlio e Ilma que sempre estiveram do meu lado me apoiando e ensinando o caminho certo a seguir. Muito obrigada pela confiança, carinho e amor, pois sem eles não teria chegado onde cheguei.

Às minhas amadas irmãs Luciana, Simone e Daiana que sempre estão ao meu lado me incentivando e se orgulhando de cada passo que dou.

Ao meu noivo Matheus que soube compreender meus momentos de ausência, principalmente quando tive de passar alguns meses em Campinas e pelo incentivo e confiança que sempre foram muito importantes para mim.

Ao Professor André, pela contribuição no meu crescimento profissional, orientação, apoio e amizade.

À Professora Janaína, que muito contribuiu para o desenvolvimento da minha Dissertação.

À Elisane pela amizade, apoio e auxílio que sempre me prestou quando precisei.

À Fátima (Fifa) pelo apoio técnico que me forneceu, sempre disposta e muito atenciosa.

Às minhas queridas Luciana e Renata, que me ajudaram no desenvolvimento da parte prática deste trabalho, bem como pela ótima companhia e dedicação.

À minha grande amiga e confidente Fabiana por sempre estar disposta a me ouvir e ajudar.

Às minhas queridas Ana Paula e Fernanda por me acolherem gentilmente em sua casa em Campinas, quando precisei passar uma temporada por lá.

A todos os colegas de laboratório de Engenharia de Bioprocessos pela companhia e convivência sempre muito agradáveis.

Aos laboratórios de Engenharia Bioquímica (Campinas), Microbiologia e Análise de Alimentos (FURG) pela disponibilidade de equipamentos.

As demais pessoas especiais que me apoiaram e deram motivação para continuar concentrada principalmente no final desta jornada.

Ao Programa de Cooperação Acadêmica (PROCAD) da CAPES e à FAPERGS, pelo apoio financeiro ao projeto.

À CAPES pela concessão de bolsa de pós-graduação.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
RESUMO	xi
ABSTRACT	xii
CAPÍTULO I	
INTRODUÇÃO GERAL	1
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
2.1. Objetivo geral	3
2.2. Objetivos específicos	3
CAPÍTULO II	
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
1.1. Soro de Leite	5
1.2. Lactose	5
1.3. Oligossacarídeos	6
1.3.1. Propriedades dos oligossacarídeos	7
1.3.2. Classificação dos oligossacarídeos	7
1.3.3. Quantificação de oligossacarídeos	8
1.4 Galactooligossacarídeos	9
1.5 Benefícios à Saúde Atribuídos ao Consumo de Galactooligossacarídeos	12
1.6 Síntese de Galactooligossacarídeos	14
1.6.1. Efeito da temperatura na síntese de galactooligossacarídeos	15
1.6.3. Efeito da concentração de lactose na síntese de galactooligossacarídeos	17
CAPÍTULO III	
DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO	19
ARTIGO 1: INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA, CONCENTRAÇÃO DE ENZIMA E CONCENTRAÇÃO DE LACTOSE NA SÍNTESE ENZIMÁTICA DE GALACTOOLIGOSSACARÍDEOS POR β-GALACTOSIDASE	21
INFLUENCE OF THE TEMPERATURE, CONCENTRATION OF ENZYME AND CONCENTRATION OF LACTOSE ON THE ENZYMIC SYNTHESIS OF GALACTOOLIGOSACCHARÍDEOS BY β -GALACTOSIDASE	22
1. INTRODUÇÃO	23
2. MATERIAL E MÉTODOS	24

2.1. Enzima	24
2.2. Síntese de Galactooligossacarídeos.....	24
2.3. Planejamento Fatorial.....	24
2.4. Identificação e Quantificação dos Carboidratos por Cromatografia de Íons (HPLC-PAD).....	26
2.4.1. Preparo da fase móvel.....	26
2.4.2. Curva de calibração.....	26
2.4.3. Preparo das amostras.....	27
2.4.4. Identificação e quantificação das amostras.....	27
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
3.1. Síntese Enzimática de Galactooligossacarídeos	27
3.2. Influência da Temperatura, Concentração de Enzima e Concentração de Lactose	32
4. CONCLUSÕES.....	35
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35
ARTIGO 2: BIOTRANSFORMAÇÃO DO SORO DE LEITE COM β-GALACTOSIDASE VISANDO SEU ENRIQUECIMENTO EM GALACTOOLIGOSSACARÍDEOS.....	39
BIOTRANSFORMATION OF WHEY WITH β-GALACTOSIDASE FOR GALACTOOLIGOSACCHARIDES ENRICHMENT.....	40
1. INTRODUÇÃO	40
2. MATERIAL E MÉTODOS	41
2.1. Enzima	41
2.2. Soro de Leite	42
2.3. Caracterização do Soro de Leite	42
2.3.1. Proteína.....	42
2.3.2. Umidade	42
2.3.3. Minerais.....	42
2.3.4. Gordura	42
2.4. Síntese de Galactooligossacarídeos.....	42
2.5. Planejamento Fatorial.....	43
2.6. Identificação e Quantificação dos Carboidratos por Cromatografia de Íons (HPLC-PAD).....	45
2.6.1. Preparo da fase móvel.....	45
2.6.2. Curva de calibração.....	45
2.6.3. Preparo das amostras.....	45

2.6.4. Identificação e quantificação das amostras.....	45
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	46
3.1. Caracterização do Soro de Leite	46
3.2. Síntese de Galactooligossacarídeos a Partir do Soro de Leite	46
3.3. Planejamento Experimental e Análise de Superfície de Resposta.....	51
3.3.1. Concentração de GOS.....	52
3.3.2. Rendimento	55
3.3.3. Produtividade.....	58
3.3.4. Conversão de lactose	62
3.4. Efeito da Temperatura, Concentração de Enzima e Concentração de Lactose na Reação Enzimática.....	63
3.4.1. Efeito da temperatura	63
3.4.2. Efeito da concentração da enzima.....	63
3.4.3. Efeito da concentração de lactose	63
4. CONCLUSÕES.....	64
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64
CAPÍTULO IV	
CONCLUSÕES GERAIS E SUGESTÕES	67
1. CONCLUSÕES GERAIS.....	68
2. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	69
CAPÍTULO V	
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70
1. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO III

ARTIGO 1

Influência da Temperatura, Concentração de Enzima e Concentração de Lactose na Síntese Enzimática de Galactooligossacarídeos por β -Galactosidase

Tabela 1: Matriz do planejamento experimental 2^3 com variáveis reais e codificadas.26

Tabela 2: Matriz do planejamento experimental 2^3 e suas respostas32

CAPÍTULO III

ARTIGO 2

Biotransformação do Soro de Leite com β -Galactosidase Visando seu Enriquecimento em Galactooligossacarídeos

Tabela 1: Matriz do planejamento experimental 2^3 com variáveis reais e codificadas.44

Tabela 2: Composição do soro de leite desidratado.....46

Tabela 3: Matriz do planejamento experimental 2^3 suas respostas51

Tabela 4: Análise de variância para a resposta concentração de GOS.....53

Tabela 5: Análise de variância para a resposta rendimento56

Tabela 6: Análise de variância para produtividade.....60

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO II

ARTIGO 1

Revisão Bibliográfica

Figura 1: Estrutura química da lactose	6
Figura 2: Processo de produção industrial de galactooligossacarídeos	11
Figura 3: Estrutura química dos galactooligossacarídeos	12
Figura 4: Esquema do mecanismo da hidrólise da lactose por β -galactosidase	15

CAPÍTULO III

ARTIGO 2

Influência da Temperatura, Concentração de Enzima e Concentração de Lactose na Síntese Enzimática de Galactooligossacarídeos por β -Galactosidase

Figura 1: Concentração de açúcares durante a ação de Lactozym [®] 3000L sobre a lactose.....	28
Figura 2: Perfil cromatográfico da síntese enzimática de galactooligossacarídeos utilizando como substrato lactose.....	29
Figura 3: Concentração em GOS, rendimento, produtividade e conversão de lactose em função do tempo de reação	30
Figura 4: Efeitos principais e de interação das variáveis temperatura (T), concentração de enzima (C_E) e concentração de lactose (C_L).....	33

CAPÍTULO III

Biotransformação do Soro de Leite com β -Galactosidase Visando seu Enriquecimento em Galactooligossacarídeos

Figura 1: Concentração de açúcares durante a conversão de lactose, utilizando como substrato soro de leite	47
Figura 2: Perfil cromatográfico na síntese enzimática de galactooligossacarídeos utilizando como substrato soro de leite.....	48
Figura 3: Concentração em GOS, rendimento, produtividade e conversão de lactose ao longo do tempo	50
Figura 4: Efeitos principais e de interação das variáveis temperatura, concentração de enzima e concentração de lactose na concentração de GOS	52
Figura 5: Superfícies de resposta e curvas de contorno para a concentração de GOS	54
Figura 6: Efeitos principais e de interação das variáveis temperatura, concentração de enzima e concentração de lactose no rendimento.....	55

Figura 7: Superfícies de resposta e curvas de contorno para o rendimento.....	57
Figura 8: Efeitos principais e de interação das variáveis temperatura, concentração de enzima e concentração de lactose na produtividade	59
Figura 9: Superfícies de resposta e curvas de contorno para produtividade.....	61
Figura 10: Efeitos principais e de interação das variáveis temperatura, concentração de enzima e concentração de lactose na conversão de lactose	62

RESUMO

Os galactooligossacarídeos (GOS) vêm sendo considerados como novos ingredientes funcionais dos alimentos, apresentando um grande potencial para melhorar a qualidade dos mesmos, sendo denominados como prebióticos, devido às suas características fisiológicas e tecnológicas. Podem ser produzidos a partir de lactose, principal açúcar presente no soro de leite, através de uma reação enzimática com o uso da enzima β -galactosidase, que possui atividade de transgalactosilação. Este trabalho tem como objetivo principal estudar a obtenção de galactooligosacarídeos por via enzimática. Foi utilizada β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* Lactozym[®] 3000L (Novozymes) e, como substratos, a lactose e o soro de leite. Um planejamento experimental 2³ totalizando 11 ensaios foi proposto para cada um dos substratos, verificando-se a influência da temperatura (30 a 40 °C), concentração de lactose (20 a 40%) e concentração da enzima (5 a 10 U.mL⁻¹), obtendo-se como respostas a concentração de GOS máxima, o rendimento de GOS máximo, a produtividade de GOS máxima e conversão de lactose máxima. Os ensaios foram conduzidos a 180 rpm de agitação, em meio aquoso e pH 7,0 (tampão fosfato de sódio 0,1M), retirando-se alíquotas ao longo do tempo, sendo os açúcares presentes em cada amostra quantificados através de um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência HPLC-PAD (Dionex). A enzima Lactozym[®] 3000L apresentou atividade de transgalactosilação na presença dos dois substratos. Utilizando como substrato lactose o rendimento atingiu 43,8% e a concentração de GOS foi de 175,3 g/L no sistema reacional composto por 40% de lactose e 10 U.mL⁻¹ de enzima a 30 °C. No entanto a produtividade máxima alcançada, de 41,1 g.L⁻¹.h⁻¹, bem como a máxima conversão de lactose (80,5%), foram obtidas em condições de síntese distintas. Utilizando como substrato soro de leite, os valores máximos obtidos para as respostas concentração de GOS (119,8 g.L⁻¹) e rendimento (29,95%) em 4 h de processo foram obtidos no sistema reacional composto por 40% de lactose e 10 U.mL⁻¹ de enzima a 40 °C. Nestas condições a produtividade máxima alcançada foi de 64,4 g.L⁻¹.h⁻¹. O máximo valor alcançado para conversão de lactose (87,8%) foi obtido nas mesmas condições de temperatura e concentração de enzima, mas com 20% de lactose.

Palavras-chaves: Síntese enzimática, β -galactosidase, galactooligossacarídeos, lactose e soro de leite

ABSTRACT

Galactooligosaccharides (GOS) have been considered as new functional food ingredients, presenting a great potential to improve its quality. They are denominated as prebiotics, due to their physiological and technological characteristics. They can be produced from lactose, the main sugar of the whey, through an enzymatic reaction with the use of the enzyme β -galactosidase, with transgalactosylation activity. The main goal of this work was to study the enzymatic production of galactooligosaccharides. It was used β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* Lactozym® 3000L (Novozymes) and, as substrates, lactose and whey. A 2^3 experimental design (11 assays) was proposed for each substrate, verifying the effect of the temperature (30 to 40 °C), lactose concentration (20 to 40%) and concentration of the enzyme (5 to 10 U.mL⁻¹). The responses were maximum GOS concentration, maximum GOS yield, maximum productivity and maximum lactose conversion. Assays were carried out at 180 rpm in aqueous medium and pH 7.0 (0.1 M sodium phosphate buffer). Samples were collected and sugars were quantified by high performance liquid chromatography (HPLC-PAD system, Dionex). For lactose the yield reached 43.8% and GOS concentration was 175.3 g.L⁻¹, in the system composed by 40% of lactose and 10 U.mL⁻¹ of enzyme at 30 °C. However, maximum productivity (41.1 g.L⁻¹.h⁻¹) as well as maximum lactose conversion (80.5%) were obtained in different conditions. For whey, the maximum values for the responses GOS concentration (119.8 g.L⁻¹) and yield (29.95%) in 4 h of process were obtained in the system composed by 40% of lactose and 10 U.mL⁻¹ of enzyme at 40 °C. In these conditions, maximum productivity was 64.4 g.L⁻¹.h⁻¹. The maximum value for lactose conversion (87.8%) was obtained in the same temperature and enzyme concentration, but with 20% of lactose.

Key-Words: Enzymatic synthesis, β -galactosidase, galactooligosaccharides, lactose and whey.

CAPÍTULO I
INTRODUÇÃO GERAL

1. INTRODUÇÃO

A produção mundial de soro de leite chega ao redor de 130 milhões de toneladas por ano, com uma produção crescente de queijo a uma taxa de 3% ao ano, aproximadamente. Este produto constitui uma grande fonte de nutrientes, o que tem estimulado o interesse no desenvolvimento de processos viáveis em converter soro em bioingrediente alimentar de alto valor agregado (FODA & LOPEZ-LEIVA, 2000).

Os oligossacarídeos são classificados como prebióticos, porque além de não serem hidrolisados e nem absorvidos na parte superior do trato gastrointestinal, eles promovem de uma forma seletiva o crescimento e/ou estimulam a atividade metabólica de bactérias benéficas à saúde, sendo o crescimento de bifidobactérias considerado o principal objetivo dos prebióticos (SANTOS, 2002).

Os efeitos benéficos à saúde obtidos pela ingestão de oligossacarídeos não digeríveis também se assemelham àqueles atribuídos à fibra dietética, pois aumentam o bolo intestinal, reduzem o trânsito gastrointestinal e podem melhorar a digestão e absorção de nutrientes no intestino. Oligossacarídeos são encontrados na natureza na maioria dos vegetais (frutas e legumes), leite e mel, na forma livre ou combinada. Sua utilização como alimento funcional está proposta desde 1980 (CRITTENDEN & PLAYNE, 1996).

Os oligossacarídeos são utilizados como novos ingredientes funcionais dos alimentos, apresentando um grande potencial para promover a qualidade de muitos alimentos. A sua adição nos alimentos irá promover modificações no “flavour” e nas características físico-químicas, e muitos desses açúcares possuem propriedades que beneficiam a saúde de seus consumidores. O principal interesse na produção de oligossacarídeos não se encontra particularmente em seu uso como adoçante alternativo, mas sim no estímulo à produção de bifidobactérias com os seguintes efeitos benéficos: manutenção normal da microflora intestinal, maior tolerância à lactose, atividade anti-cancerígena, estímulo do sistema imunológico, melhora do valor nutricional dos alimentos, entre outros (CRITTENDEN & PLAYNE, 1996).

A β -galactosidase é uma das enzimas mais estudadas e retratadas na literatura. Pode ser encontrada na natureza, distribuída entre vegetais, particularmente em amêndoas, pêssegos, damascos e maçãs, em órgãos de animais como intestino, cérebro e placenta e também é produzida por uma grande quantidade de

microrganismos como leveduras, fungos e bactérias, sendo esta a fonte mais aceitável para a produção e aplicação industrial (RICHMOND & STINE, 1981).

A β -galactosidase (β -D-galactosídeo galactohidrolase, EC 3.2.1.23) é uma importante enzima utilizada industrialmente na hidrólise de lactose do leite e de soro de queijo. Este dissacarídeo de baixo poder adoçante ao ser ingerido por pessoas intolerantes alcança o intestino delgado sem ser afetado e finalmente sofre fermentação microbiana no intestino grosso, causando inchaço abdominal, diarreia e outros distúrbios gastrintestinais (CRITTENDEN & PLAYNE, 1996).

Os galactooligossacarídeos (GOS) podem ser produzidos a partir da lactose através de uma reação enzimática com o uso da β -galactosidase conhecida como transgalactosilação (CHEN et al., 2002). Os produtos (açúcares) obtidos desta reação são os galactooligossacarídeos, glicose e galactose (ALMEIDA, 2003), podendo-se conseguir, desta forma, a obtenção de produtos de alto valor agregado a partir do soro de leite ou outro substrato que contenha a lactose. Os GOS são compostos por moléculas de galactose ligadas à lactose, sendo formados de tri a hexassacarídeos com 2-5 unidades de galactose (SAKO et al., 1999).

O estabelecimento de bifidobactérias na microbiota intestinal de lactantes, tem sido atribuído à presença de oligossacarídeos contendo galactose em leite materno. Assim a inclusão de galactooligossacarídeos como ingredientes de alimentos infantis tem despertado um considerável interesse comercial, e várias companhias estão envolvidas com a produção destes bioprodutos (ALMEIDA, 2003). O presente trabalho vem contribuir nestes estudos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Este trabalho tem como objetivo principal estudar a obtenção de galactooligosacarídeos, através da reação enzimática com β -galactosidase comercial de *Kluyveromyces lactis* (Lactozym® 3000L).

2.2. Objetivos específicos

- Verificar a influência das variáveis: temperatura, concentração de enzima e concentração de lactose na formação de galactooligossacarídeos, tendo como substrato a lactose;

- Verificar a influência das variáveis: concentração de enzima, concentração de lactose e temperatura na formação de galactooligossacarídeos, tendo como substrato soro de leite.

CAPÍTULO II
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

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. Contém cerca de 55% dos sólidos existentes no leite integral original e apresenta cerca de 80% a 90% do volume de leite utilizado na fabricação de queijo (ANDRADE & MARTINS, 2002). Ele é o principal co-produto da indústria de laticínios, tem na sua constituição proteínas e carboidratos, sendo assim uma importante fonte nutritiva, e é caracterizado por elevados valores de DBO (Demanda Bioquímica de Oxigênio), na faixa de 30-60 Kg.m⁻³. Seu descarte diretamente em rios ou esgotos públicos atualmente não é permitido, mas em média cada tonelada de soro não tratado despejado por dia no sistema de tratamento de esgoto equivale à poluição diária de cerca de 470 pessoas (HATZINIKOLAOU et al., 2005).

O Brasil é o sexto maior produtor mundial de leite bovino, com uma taxa anual de aumento da produção na faixa de 4%. Boa parte da produção é destinada à fabricação de queijos, onde as maiores produções são de queijo mussarela, prato e minas frescal (MESOMO, 2007).

A utilização do soro é de grande interesse global em termos de aspectos econômicos, ambientais e de saúde. A produção dos oligossacarídeos a partir de lactose existente no soro tem atraído a atenção dos cientistas e da indústria de alimentos, pelo potencial dos oligossacarídeos como ingredientes em alimentos funcionais (RUSTOM, 1998).

1.2. Lactose

A lactose, ilustrada na Figura 1, é um glicídeo, açúcar que está presente no leite e seus derivados. Todos os açúcares são formados por unidades de sacarídeos. A lactose é formada por duas dessas unidades, a glicose e a galactose, sendo um dissacarídeo com baixo poder adoçante (BOBBIO & BOBBIO, 1992).

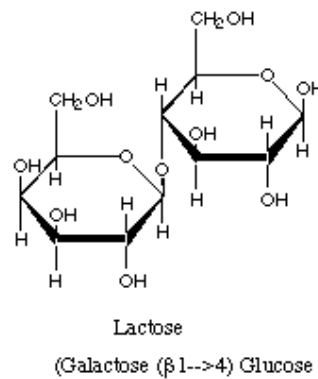


Figura 1: Estrutura química da lactose.

É um açúcar muito raro, que só se encontra praticamente no leite, é solúvel em água, sendo que sua solubilidade aumenta sob o calor, cristalizando ao esfriar, quando está em soluções concentradas. Tem um sabor levemente adocicado em comparação com os outros açúcares (sacarose, glicose). Reage com as proteínas do leite ou soro, escurecendo-as (reações de Maillard). A altas temperaturas (110 - 150 °C) e prolongados períodos de tempo (10 a 20 min) ela se degrada, escurecendo o leite e dando-lhe um sabor cozido (BOBBIO & BOBBIO, 1992; BECERRA & GONSÁLEZ SISO, 1996; MAHONEY, 1998).

A lactose é um dos principais constituintes do soro de leite, sendo que sua hidrólise enzimática irá gerar glicose e galactose (maiores quantidades), também formando uma quantidade considerável de oligossacarídeos (LOPEZ-LEIVA & GUZMAN, 1995).

1.3. Oligossacarídeos

Os oligossacarídeos são compostos de monossacarídeos unidos por ligações glicosídicas, em número que variam de três a dez unidades. Entretanto, muitos dissacarídeos possuem propriedades similares aos açúcares de moléculas maiores, e são freqüentemente os principais componentes de produtos de oligossacarídeos de grau alimentar (SCHIWECK et al., 1995).

Recentemente um grande número de pesquisas sobre a produção e aplicação de oligossacarídeos e polissacarídeos tem surgido devido às suas propriedades fisiológicas e tecnológicas. Baseando-se em suas propriedades físico-químicas e bioquímicas, os oligossacarídeos têm encontrado aplicação na indústria de alimentos, em produtos utilizados para a alimentação humana (bebidas, adoçantes, formulação de leite em pó infantil), animal (ração animal com inibidor de salmonela) e

aplicação medicinal (cosméticos, produtos farmacêuticos e produtos para diabéticos). Entretanto o principal interesse na produção de oligossacarídeos não se encontra particularmente no seu uso como adoçante alternativo, mas sim no estímulo da produção de bifidobactérias (CRITTENDEN & PLAYNE, 1996).

Os oligossacarídeos não digeríveis mais utilizados como ingredientes em alimentos são os frutooligossacarídeos e galactooligossacarídeos, que são geralmente produzidos por transglicosilação enzimática (SAKO et al., 1999).

1.3.1. Propriedades dos oligossacarídeos

Os oligossacarídeos são solúveis em água e possuem um baixo poder adoçante, correspondendo a aproximadamente 0,3 a 0,6 vezes em relação à sacarose. A doçura dos produtos contendo oligossacarídeos está diretamente relacionada com a estrutura química, a massa molecular e níveis de mono e dissacarídeos presentes na mistura. É importante ressaltar que a doçura dos oligossacarídeos relativamente baixa torna-os bastante desejáveis como ingredientes em produtos onde existe necessidade de acentuar a textura, o sabor e outras propriedades de alimentos com uma doçura reduzida (CRITTENDEN & PLAYNE, 1996).

A habilidade de muitos oligossacarídeos promoverem a proliferação das bifidobactérias no cólon tem sido muito estudada. Acredita-se que estas bactérias são importantes para a saúde e juntamente com outros microrganismos são denominadas de probióticos. Os oligossacarídeos têm sido descritos como prebióticos, por estimularem o crescimento da microbiota benéfica (CRITTENDEN & PLAYNE, 1996).

1.3.2. Classificação dos oligossacarídeos

Dentre os oligossacarídeos produzidos comercialmente pode-se citar como exemplos os frutooligossacarídeos obtidos a partir da sacarose pela ação de transfrutossilação da enzima β -frutofuranosidase (EC 3.2.1.26) ou pela β -frutotransferase. A lactosacarose é produzida a partir da mistura da lactose e sacarose usando a ação de transfrutossilação da enzima β -frutofuranosidase (EC 3.2.1.26). A palatinose, também conhecida como isomaltulose, é produzida a partir da sacarose usando isomaltulose imobilizada (EC 5.4.99.11). A glicosil-sacarose é produzida a partir da maltose e da sacarose sob a ação da enzima glucanotransferase (EC 2.4.1.19). Os galactooligossacarídeos são obtidos a partir de lactose pela ação da

β -galactosiltransferase e da enzima β -galactosidase (EC 3.2.1.23) (CRITTENDEN & PLAYNE, 1996).

1.3.3. Quantificação de oligossacarídeos

A quantidade de oligossacarídeos formada irá depender da origem da enzima. Desse modo, a quantidade total de oligossacarídeo formado pode variar de 1 a 45% do total de açúcares formados (MAHONEY, 1998).

O resultado da síntese é uma mistura complexa de di -, tri - e tetrassacarídeos, entre outros. A separação dos produtos da síntese pode ser conseguida por cromatografia líquida, em papel ou gasosa. Uma separação preliminar de algumas classes pelo tamanho do açúcar pode ser conseguida com eluição em etanol (MAHONEY, 1998).

A cromatografia em papel tem sido utilizada há muitos anos para a separação dos oligossacarídeos (HUH et al., 1990, SANTOS, 2006). Este método tem boa capacidade de separar oligossacarídeos pelo seu tamanho, entretanto, a quantificação é frequentemente imprecisa em comparação a outros métodos.

A separação por cromatografia gasosa requer, primeiramente, a metilação dos açúcares (SMART, 1990). A análise e identificação dos picos é complexa devido à separação dos anômeros, a menos que sejam primeiramente reduzidos (MAHONEY, 1998).

Recentes avanços da cromatografia líquida de alta eficiência HPLC (do inglês High Performance Liquid Chromatography) a tornaram um método de análise rápida e quantitativa das principais classes do oligossacarídeos (REUTER et al., 1999; FODA & LOPÉZ-LEIVA, 2000; CHEN et al., 2002; CHEN et al., 2003; CZERMAK et al., 2004).

A cromatografia de íons é definida como uma técnica de separação e quantificação de cátions e ânions, empregando colunas com resinas trocadoras de íons ou equivalentes. Esta técnica cromatográfica permite a análise de íons em soluções aquosas, empregando como fase móvel soluções iônicas num valor de pH especificado. Para fins de aplicações a cromatografia de íons pode ser dividida em cromatografia de ânions e cromatografia de cátions. Recentemente tem-se empregado o sistema de cromatografia de íons acoplado a um detector de pulso amperométrico para separação, identificação e quantificação de carboidratos (WEISS, 1995).

As principais vantagens da cromatografia de íons (HPLC-PAD) são: velocidade nas análises (por exemplo: análises de monossacarídeos podem ser realizadas em 10 min); alta resolução (separação de isômeros e anômeros de posição). Isto se deve ao tipo de resina empregada, correspondendo a resinas de microesferas onde pequenas esferas de resina de troca de ânions estão ligadas a uma grande esfera de resina de troca de cátions. Além disso, a sensibilidade obtida na faixa do sub-mol sem a necessidade de derivatização é possível devido à tecnologia de detecção de pulso amperométrico (PAD) (LEE, 1996; KUNZ et al., 1996).

Quanto às técnicas de cromatografia líquida, o sistema HPLC-IR é o método mais comum para identificação e quantificação de sacarídeos, entretanto apresenta algumas desvantagens, tais como: técnica não seletiva, pouca sensibilidade na separação dos compostos a serem identificados. Ao contrário do sistema HPLC-IR, o HPLC-PAD, é um sistema que oferece mais vantagens, principalmente em relação à sensibilidade do detector. Neste sistema é utilizado um detector de pulso amperométrico (PAD) equipado com eletrodo de ouro, aumentando desta forma a seletividade, onde este tipo de detector é específico para componentes contendo grupos funcionais ionizáveis como, por exemplo, hidroxilas, aminas e grupos sulfídricos. Ácidos carboxílicos e espécies inorgânicas não interferem neste tipo de detector. Atualmente a cromatografia de íons é o sistema mais utilizado para análise de carboidratos, pois são ácidos fracos com valores de pK na faixa de 12-14, sendo mais facilmente separados por ânions pelo controle de pH (WEISS, 1995; MARTENS & FRANKENBERGER, 1990)

1.4 Galactooligossacarídeos

Os galactooligossacarídeos (GOS) estão incluídos entre os oligossacarídeos não digeríveis (NDOs, do inglês Non Digestible Oligosaccharides) e estão licenciados como ingredientes de alimentos FOSHU (Foods for Specified Health Use) pelo Ministério da Saúde do Japão. A produção estimada de NDOs no mundo em 1995 foi de 85000 toneladas, sendo que mais da metade foi consumida no Japão (SAKO et al., 1999).

Nos GOS, produzidos a partir da lactose, a ligação entre as unidades de galactose, a eficiência da transgalactosilação e os componentes dos produtos finais dependem da enzima e das condições empregadas na reação. Embora sejam formados de tri- a hexassacarídeos com 2 a 5 unidades de galactose, é muito comum encontrar dissacarídeos transgalactosilados, consistindo em galactose e glicose com

ligações β -glicosídicas diferentes de lactose ou com duas unidades de galactose. Estes dissacarídeos são considerados NDOs desde que tenham características fisiológicas similares as dos GOS (SAKO et al., 1999).

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* e *Lactobacillus* no intestino, ocasionando um considerável benefício à saúde humana (ALANDER et al., 2001). Um outro benefício que resulta da transformação de lactose em galactooligossacarídeos é a produção de um leite com baixa concentração de lactose. Muitas pessoas em todo mundo sofrem com problemas gastrintestinais por causa do elevado índice de lactose nos produtos de leite, doença conhecida como intolerância à lactose (CURDA et al., 2006).

O estabelecimento de bifidobactérias na microbiota intestinal de lactantes tem sido atribuído à presença de oligossacarídeos contendo galactose em leite humano. Assim, a inclusão de galactooligossacarídeos como ingredientes de alimentos prebióticos tem tido considerável interesse comercial, e várias companhias estão envolvidas com a sua produção. Os galactooligossacarídeos são produzidos a partir da lactose através da atividade da enzima β -galactosidase (E.C. 3.2.1.23) (ALMEIDA, 2003). Conhecida como transgalactosilação (CHEN et al., 2002). Os produtos (açúcares) obtidos desta reação são os galactooligossacarídeos, glicose e galactose (ALMEIDA, 2003).

A Figura 2 mostra um processo industrial para a produção de GOS. A lactose usada como substrato na reação é geralmente purificada de soro de leite de vaca. Os principais produtos são trissacarídeos, 4'- ou 6'-galactosil-lactose, e poucos oligossacarídeos consistindo de quatro ou mais unidades de monossacarídeos, além de grande quantidade de dissacarídeos transgalactosilados (MATSUMOTO et al., 1990).

Comercialmente os GOS são misturas de várias espécies moleculares de oligossacarídeos (mais que 55%), lactose (aproximadamente 20%), glicose (aproximadamente 20%) e uma pequena quantidade de galactose, sendo comercializados na forma líquida ou em pó.

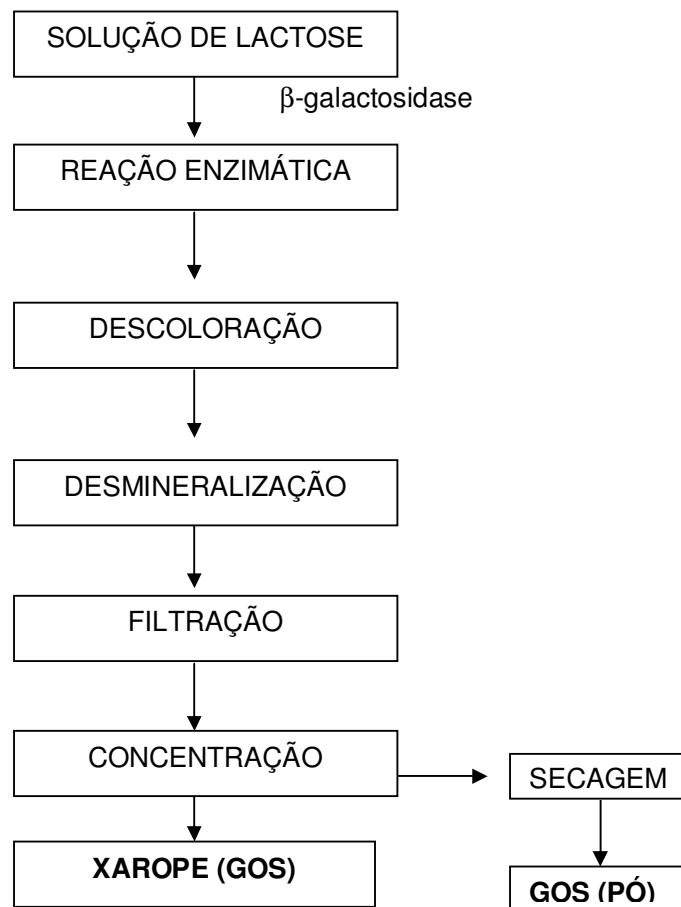


Figura 2: Processo de produção industrial de galactooligosacarídeos (MATSUMOTO et al., 1990).

Os galactooligosacarídeos podem ser usados como adoçantes, em produtos de leite fermentado, pães, geléias, bebidas e produtos de confeitaria. O pão é um alimento apropriado para a inclusão destes, pois durante a fermentação com a levedura e o cozimento, os GOS não são degradados, e auxiliam nos sabor e textura. Produtos fermentados de laticínios são outros bons exemplos de sua inclusão. Leites fermentados adicionados de GOS estão comercialmente disponíveis no Japão e na Europa. Alimentos infantis e alimentos especiais para idosos e hospitalizados são promissores para aumentar a aplicação de GOS, pois estas pessoas são mais susceptíveis a mudanças intestinais (SAKO et al., 1999).

Muitos estudos científicos têm sido realizados, em diferentes condições experimentais, para obter galactooligosacarídeos com função bifidogênica (BERGER et al., 1997; ONISHI & TANAKA, 1997; SHIN et al., 1998; CRUZ et al., 1999; REUTER et al., 1999; FODA & LOPEZ-LEIVA, 2000; PERRIN et al., 2000; HUNG & LEE, 2002; CHEN et al., 2002; ROY et al., 2002; ALMEIDA, 2003; CURDA et al., 2006; SANTOS, 2006), sendo identificados por diversas técnicas como cromatografia em papel, em camada delgada, líquida de alta eficiência, estando evidente que o tipo de galactooligosacarídeos formado é dependente do microrganismo, das condições de cultivo e do sistema empregado.

Galactooligosacarídeos consiste em uma cadeia do galactosil-galactose com um terminal glicose (Figura 3) (CZERMAK et al., 2004).

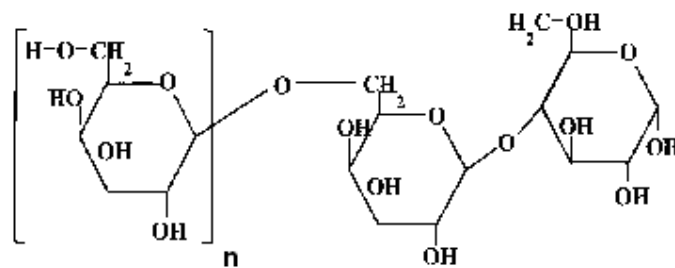


Figura 3: Estrutura química dos galactooligosacarídeos (CZERMAK et al., 2004).

1.5 Benefícios à Saúde Atribuídos ao Consumo de Galactooligosacarídeos

Alimentos funcionais estão relacionados ao desenvolvimento dos suplementos dietéticos que afetam benéficamente a composição da microbiota do intestino. A regulação da microflora intestinal melhora o bem estar das pessoas, administrado pelos probióticos e prebióticos, atraindo atenção cada vez maior de pesquisadores, indústrias e os próprios consumidores (CHOCKCHAIWASDEE et al., 2005).

Em países como o Japão, os galactooligosacarídeos são considerados oficialmente como alimentos funcionais, por causa do seu efeito similar ao das fibras. Sua ingestão estimula a proliferação de *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* no intestino humano. Com isso, esse açúcar facilita a digestão, produz ácidos graxos de cadeia curta - como o ácido acético e láctico - o que estimula a maior absorção de cálcio no intestino. Também contribui para diminuir a glicose e a pressão sanguínea e ainda tem

efeito anti-câncer, pois diminui as substâncias putrefativas originadas pela ingestão de alimentos em geral. (SANTOS, 2006; CZERMAK et al., 2004; CHEN et al., 2002; GOPAL et al., 2001; MAHONEY, 1998; CRITTENDEN & PLAYNE, 1996; LÓPEZ LEIVA & GUZMAN, 1995).

As bifidobactérias são bactérias gram-positivas, estritamente anaeróbicas, sem mobilidade e são habitantes naturais do intestino de animais e do homem (MODLER et al.,1990). São consideradas o mais importante gênero de bactérias para a saúde humana, representando entre 85 a 99% da flora intestinal de crianças. Em adultos, as bifidobactérias representam o terceiro ou quarto maior grupo de microrganismos, enquanto coliformes, clostrídios e lactobacilos apresentam-se, normalmente, em torno de 15%. Ao longo da vida de um indivíduo, *Bifidobacterium infantis* e *Bifidobacterium breve* são substituídos por *Bifidobacterium adolescentis*, enquanto *Bifidobacterium longus* persistem por toda a vida. Bifidobactérias são consideradas mais importantes no organismo de bebês, enquanto lactobacilos e *Escherichia coli* são mais numerosas em adultos, pois a contagem de bifidobactérias diminui com o avanço de idade, como resultado da diminuição da secreção de sucos gastrintestinais, o que causa a perda de imunidade e doenças como o câncer (TOMOMATSU, 1994). Assim torna-se claro que bifidobactérias são um dos principais grupos de organismos na flora intestinal de seres humanos, e a sua redução ou desaparecimento no intestino indica um estado “não saudável” (MITSUOKA, 1990). Compostos que não são metabolizados pelo hospedeiro e alcançam o intestino para serem metabolizados por bifidobactérias são considerados fatores bifidogênicos. Essencialmente, estes compostos são carboidratos que são utilizados pela bifidobactérias como fonte de energia (ALMEIDA & PASTORE, 2001).

As bifidobactérias parecem ter efeitos benéficos para humanos e animais por vários mecanismos, como imunopotenciação, acidificação intestinal através da produção de ácidos orgânicos e competição com bactérias menos desejáveis por nutrientes e sítios de ligação na parede intestinal. A produção de ácidos orgânicos (acético e láctico) limita o crescimento de bactérias putrefativas e patogênicas, conseqüentemente diminuindo a presença de substâncias nocivas ao hospedeiro como amônia e aminas (toxinas no fígado), nitrosaminas (carcinógenos), fenóis e cresóis (promotores de câncer), estrógenos (promotores de câncer de mama), ácidos biliares secundários (promotores de câncer de cólon) e agliconas (mutagênicos) (MODLER, 1994; TOMOMATSU,1994).

As doses diárias efetivas de galactooligosacarídeos na forma pura são entre 2,0 a 2,5 g. Sua indigestibilidade se dá porque apresentam configuração β e as enzimas digestivas gastrintestinais humanas são principalmente específicas para ligação α . Isto faz os GOS resistentes à digestão e absorção no intestino permitindo que atinjam o ceco e o cólon, onde são fermentados por bactérias. O fato dos oligossacarídeos não serem digeridos pelos sucos digestivos humanos leva à comparação destas com as fibras, e os benefícios à saúde assemelham-se aos atribuídos às dietas ricas em fibras. Entretanto, não apresentam os efeitos físicos destas, como o aumento da viscosidade, e a contribuição ocorre devido às características fermentativas. As vantagens dos oligossacarídeos sobre as fibras estão em requererem menores doses recomendadas, serem levemente adocicados, não apresentarem textura e sabor desagradáveis, serem completamente solúveis em água, não se ligarem com minerais, serem fisicamente estáveis e mais fáceis de incorporar em alimentos e bebidas processados (TOMOMATSU, 1994).

Os açúcares prebióticos são os mais efetivos, principalmente para crianças. Eles evitam diarreia e cólicas e aumentam a imunidade dos bebês (SANTOS, 2006).

1.6 Síntese de Galactooligosacarídeos

A importância industrial da β -galactosidase está em sua aplicação na indústria de laticínios. Esta enzima hidrolisa a lactose, carboidrato característico do leite e conhecido popularmente como “açúcar do leite”, em dois monossacarídeos glicose e galactose, obtendo alimentos com baixos teores de lactose, melhorando a solubilidade e digestibilidade do leite e derivados lácteos, ideais para consumidores intolerantes à lactose (SANTIAGO et al., 2004).

O mecanismo da reação de hidrólise da lactose por β -galactosidase é mostrado na Figura 4. A primeira etapa é a formação do complexo enzima-galactosil e a liberação simultânea da glicose. Na segunda etapa, o complexo enzima-galactosil é transferido a um aceptor que contém um grupo hidroxila. Quando em uma solução diluída de lactose, a água é mais competitiva como aceptor que outros açúcares tais como glicose e lactose, a galactose é formada e liberada do sítio ativo. Em uma solução com elevada concentração de lactose, a molécula de lactose tem mais possibilidades de agir como aceptor, ligando com o complexo enzima-galactose para formar oligossacarídeos (ZHOU & CHEN, 2001).

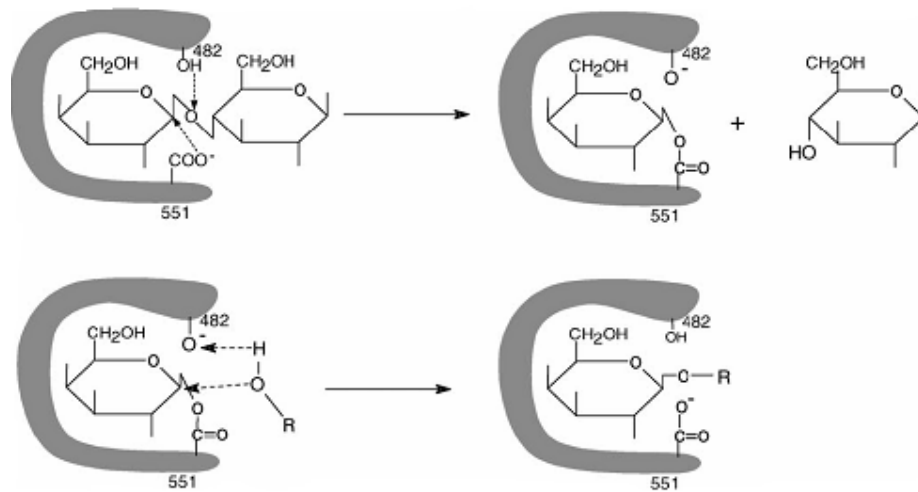


Figura 4: Esquema do mecanismo da hidrólise da lactose por β -galactosidase.

Muitos pesquisadores têm utilizado diversas fontes de β -galactosidase para estudar sua capacidade de transgalactosilação. Entre os microrganismos estudados pode-se citar: *Bullera singularis* (SHIN et al., 1998), *Sulfolobus solfataricus*, *Penicillium simplicissimum* (CRUZ et al., 1999), *Aspergillus oryzae*, *Escherichia coli* (REUTER et al., 1999), *Rhizomucor sp.* (SHAIKH et al., 1999), *Kluyveromyces lactis* (FODA & LOPEZ-LEIVA, 2000), *Bacillus circulans*, *Kluyveromyces fragilis* (BOON et al., 2000), *Streptococcus thermophilus* (PERRIN et al., 2000), *Aspergillus aculeatus* (DEL-VAL & OTERO, 2003), *Scopulariopsis sp* (ALMEIDA, 2003; SANTOS, 2006), *Bifidobacterium longum* BCRC 157C8 (HSU et al., 2007), *Lactobacillus reuteri* (SPLECHTNA et al., 2007).

O número de oligossacarídeos formados a partir da lactose via reação de transferência varia de três a onze (AKIYAMA et al., 2001). A quantidade e a natureza de galactooligossacarídeos formados depende de fatores como fonte da enzima, a concentração e natureza do substrato, o grau de conversão do substrato e as condições de reação (MAHONEY, 1998).

1.6.1. Efeito da temperatura na síntese de galactooligossacarídeos

Onishi & Tanaka (1995) verificaram que a temperatura ótima para reação de transgalactosilação foi de 80°C, dentre as estudadas, para β -galactosidase de *Sterigmatomyces elviae* CBS8119.

Boon et al. (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 (24 mol.mol⁻¹) em temperaturas mais altas, sendo considerado uma vantagem adicional a influência da concentração inicial da lactose.

Chen et al. (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.

Almeida (2003), estudando β -galactosidase de *Scopulariopsis* sp, observou o aumento da produção de GOS até 24 h nos sistemas a 35, 40 e 45°C e neste mesmo tempo uma queda da produção para as temperaturas de 50, 55 e 60°C. Em temperaturas mais elevadas a síntese de oligossacarídeos foi acelerada até 6 h de reação e em seguida ocorreu uma diminuição. Em 24 h de reação a temperatura ótima para produção de GOS foi 35°C, produzindo 21,6% de GOS. Entretanto a maior produção de GOS ocorreu entre 9 e 12 h de reação, quando os parâmetros reacionais foram fixados em 40% de lactose a 45°C e pH 5,5, produzindo 88 mg.mL⁻¹ de GOS com uma conversão de 22% da lactose.

Santos (2006), estudando o efeito da temperatura na síntese de galactooligossacarídeos por β -galactosidase de *Scopulariopsis* sp., testou 35, 45 e 60°C. Quando a temperatura do sistema de reação era de 35°C não houve produção de GOS, em 45°C verificou-se a produção de GOS em todos os tempos e finalmente a 60°C não houve produção de GOS, observando-se que a temperatura elevada desfavorece a sua produção.

1.6.2 Efeito da concentração da enzima na síntese de galactooligossacarídeos

Almeida (2003), estudando β -galactosidase de *Scopulariopsis* sp, observou que após 24 h de reação as concentrações de 4 e 6 U.mL⁻¹ de β -galactosidase apresentaram maior produção de GOS. Com 0,5 U.mL⁻¹ foi obtido o menor rendimento até 48 h de reação e com 1 U.mL⁻¹ houve a necessidade de mais tempo para se alcançar os mesmos níveis obtidos com 2 U.mL⁻¹ de enzima. Aumentando a concentração de β -galactosidase para 8 e 10 U.mL⁻¹ não houve melhora no rendimento, indicando que o aumento da concentração da enzima não é proporcional ao aumento da síntese de oligossacarídeos, e que a limitação da produção não está relacionada apenas com a concentração da enzima.

Chockchaisawasdee et al. (2005) estudaram a síntese de galactooligossacarídeos de β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* (Maxilact® L2000) utilizando como substrato lactose. Para o estudo da síntese enzimática variaram a concentração de lactose de 220 a 400 mg.mL⁻¹ e concentração de enzima de 3 a 9 U.mL⁻¹ a 40°C e pH 7. A máxima concentração de GOS (99 mg.mL⁻¹) foi observada quando o sistema foi composto por 400 mg.mL⁻¹ de lactose e 5,8 U.mL⁻¹.

Santos (2006), com o propósito de avaliar o efeito da concentração de β -galactosidase na síntese de GOS, testou várias concentrações da enzima. Com as menores concentrações de enzima (0,5; 1 e 2 U.mL⁻¹) ocorreu aumento gradativo da síntese de GOS. Nas concentrações mais elevadas (6-8 U.mL⁻¹), o maior rendimento foi verificado em 24 h de reação, ocorrendo em seguida uma diminuição da produção.

1.6.3. Efeito da concentração de lactose na síntese de galactooligossacarídeos

A reação de transgalactosilação na formação de GOS ocorre pela transferência do resíduo de açúcar que forma a parte glicona da molécula do substrato para outra molécula de lactose. Quando a transferência é feita para a água, a reação é de hidrólise (AKIYAMA et al., 2001). Também pode ser considerada a reação de transferência como competição entre a água e moléculas de açúcar pelo complexo enzima-substrato. Atribui-se a este efeito o aumento da concentração de lactose que aumenta a quantidade de oligossacarídeos presentes (CHOCKCHAISAWASDEE et al., 2005).

Chockchaisawasdee et al. (2005) testaram na produção de GOS quatro concentrações de lactose, sendo 220, 280, 340 e 400 mg.mL⁻¹, juntamente com 2,9, 5,8 e 8,7 U.mL⁻¹ da enzima β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis*. Obtiveram a

concentração máxima de GOS com 400 mg.mL⁻¹ de lactose (40%), e 5,8 U.mL⁻¹ da enzima, na temperatura de 40°C, pH 7,0, em 4 h.

Santos (2006) estudou o efeito da concentração de lactose em três diferentes níveis (10% , 25% e 40%) para a produção de galactooligosacarídeos, 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⁻¹ de 4'galactosyl-lactose) em 12 h de reação com 40% de lactose.

Chen et al. (2001), estudando a produção de galactooligosacarídeos em meio com AOT/isooctano, observaram que o máximo de GOS (51,2%) foi encontrado quando utilizaram uma concentração de lactose de 45% a 40 °C e pH 7,0.

López-Leiva e Guzman (1995), usando β-galactosidase de *Aspergillus oryzae* imobilizada, reportaram um rendimento máximo de 14% de GOS, com 20-40% de conversão de lactose em GOS.

Onishi e Tanaka (1997) obtiveram 72 mg.mL⁻¹ de GOS após incubação em 20% de lactose, pH 5, 60°C por 24 h. A utilização de lactose inicial a 14% e β-galactosidase de *A. oryzae* levou a 17,9% de oligossacarídeos, em pH 5 e 35°C (RUSTOM et al., 1998).

Shin e colaboradores (1998) produziram 160 mg.mL⁻¹ de GOS utilizando β-galactosidase de *B. singularis* em 30% de lactose a 45°C e pH 3,7.

CAPÍTULO III
DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO

ARTIGO 1

**INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA, CONCENTRAÇÃO DE ENZIMA E
CONCENTRAÇÃO DE LACTOSE NA SÍNTESE ENZIMÁTICA DE
GALACTOOLIGOSSACARÍDEOS POR β -GALACTOSIDASE**

**INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA, CONCENTRAÇÃO DE ENZIMA E
CONCENTRAÇÃO DE LACTOSE NA SÍNTESE ENZIMÁTICA DE
GALACTOOLIGOSSACARÍDEOS POR β -GALACTOSIDASE**

Lisboa, C. R.; Burkert, J. F. M.; Burkert, C. A. V.

Universidade Federal do Rio Grande, Departamento de Química, Laboratório de
Engenharia de Bioprocessos, Rua Eng. Alfredo Huch, 475, Rio Grande, RS, Brasil.

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi estudar a influência de parâmetros reacionais na obtenção via enzimática de galactooligossacarídeos (GOS), utilizando a enzima comercial β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* (Lactozym[®] 3000L), tendo como substrato lactose. Foi proposto um planejamento experimental 2³ verificando a influência da temperatura (30°C a 40°C), concentração de lactose (20% a 40%) e concentração de enzima (5 a 10 U.mL⁻¹) sobre o desempenho da reação enzimática. Os ensaios foram conduzidos a 180 rpm e pH 7,0 (tampão fosfato de sódio 0,1 M). A enzima Lactozym[®] 3000L apresentou atividade de transgalactosilação, alcançando rendimento de 43,8% e concentração de GOS de 175,3 g.L⁻¹ no sistema reacional composto por 40% de lactose e 10 U.mL⁻¹ de enzima a 30°C em 16 h de reação. Nesta condição a conversão de lactose foi de 71,5%. No entanto a produtividade máxima alcançada (41,1 g.L⁻¹.h⁻¹), bem como a máxima conversão de lactose (80,5%), foram obtidas em condições de síntese distintas.

Palavras-chaves: β -galactosidase, galactooligossacarídeos, transgalactosilação.

**INFLUENCE OF THE TEMPERATURE, CONCENTRATION OF ENZYME AND
CONCENTRATION OF LACTOSE ON THE ENZYMATIC SYNTHESIS OF
GALACTOOLIGOSACCHARÍDEOS BY β -GALACTOSIDASE**

Lisboa, C. R.; Burkert, J. F. M.; Burkert, C. A. V.

Universidade Federal do Rio Grande, Departamento de Química, Laboratório de
Engenharia de Bioprocessos, Rua Eng. Alfredo Huch, 475, Rio Grande, RS, Brasil.

ABSTRACT

The main goal of this work was to study the influence of reaction parameters on the enzymatic production of galactooligosaccharides (GOS), using the commercial β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* (Lactozym® 3000L) and lactose as substrate. A 2^3 experimental design was proposed verifying the influence of the temperature (30°C to 40°C), lactose concentration (20% to 40%) and enzyme concentration (5 to 10 U.mL⁻¹) on the performance of the enzymatic reaction. Assays were carried out at 180 rpm and pH 7.0 (0.1 M sodium phosphate buffer). The enzyme Lactozym® 3000L presented transgalactosylation activity, reaching yield of 43.8% and GOS concentration of 175.3 g.L⁻¹ in the reaction system composed by 40% of lactose and 10 U.mL⁻¹ of enzyme at 30°C in 16 h of reaction. In this condition lactose conversion was 71.5%. However, maximum productivity, of 41.1 g.L⁻¹.h⁻¹, as well as the maximum lactose conversion (80.5%), were obtained in different conditions.

Key-Words: β -galactosidase, galactooligosaccharides, transgalactosilation.

1. INTRODUÇÃO

Os oligossacarídeos são açúcares encontrados naturalmente em muitos alimentos como frutas, vegetais, leite e mel. Alguns destes não apresentam só a função nutricional ou de adoçamento, mas também exibem atividade fisiológica, sendo assim denominados de alimentos funcionais (ALMEIDA & PASTORE, 2004). Eles 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 & PLAYNE, 1996).

Galactooligosacarídeos (GOS) são carboidratos não digeríveis formados por 3 a 10 unidades de galactose e glicose. Ao serem consumidos produzem um significativo incremento na população de *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* e algumas espécies benéficas de *Streptococcus*, com a conseqüente redução da concentração de bactérias putrefativas, sendo portanto considerados prebióticos. Esta mudança na composição da flora intestinal tem sido relacionada à redução de colesterol no sangue, maior absorção de Ca^{+2} e menor incidência de câncer de cólon (CRUZ et al., 1999). Devido à sua presença no leite materno, seu uso em formulação lácteas infantis é de grande interesse (SPLECHTNA et al., 2007).

A β -galactosidase ou β -D-galactosídeo-galactohidrolase (EC 3.2.1.23) é classificada como uma hidrolase e em geral associada à hidrólise da lactose do leite na produção de lácteos de baixo teor de lactose para pessoas intolerantes a este carboidrato. No entanto, a hidrólise da ligação glicosídica de fato constitui um caso especial de transgalactosilação em que o acceptor é a água. Quando a lactose ou outro galactosídeo estruturalmente relacionado atua como acceptor, tem-se a formação de GOS (SPLECHTNA et al., 2006).

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 (MAHONEY, 1998). Por outro lado o planejamento fatorial constitui uma poderosa ferramenta para o planejamento e análise de experimentos. As variáveis são modificadas simultaneamente de uma maneira sistemática e os resultados são avaliados estatisticamente. No entanto, na literatura predomina a análise univariável dos fatores que influenciam a síntese enzimática de galactooligosacarídeos a partir da lactose utilizando β -galactosidase de diferentes fontes (BERGER et al., 1997; AKIYAMA et al., 2001; CHOCKCHAIWASDEE et al., 2005; NAKKHARAT et al., 2006; SPLECHTNA et al., 2006; HSU et al., 2007; SPLECHTNA et al., 2007).

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi estudar a influência de parâmetros reacionais na obtenção de galactooligossacarídeos (GOS) a partir da lactose utilizando a enzima comercial β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* (Lactozym[®] 3000L), aplicando a metodologia do planejamento experimental.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Enzima

A enzima utilizada foi a β -galactosidase comercial de *Kluyveromyces lactis* Lactozym[®] 3000L (3263,19 U.mL⁻¹), gentilmente cedida pela Novozymes. Uma unidade de β -galactosidase é definida como a quantidade de enzima que libera 1 μ mol de o-nitrofenol por minuto nas condições do ensaio (INCHAURRONDO et al., 1994).

2.2. Síntese de Galactooligossacarídeos

As reações de síntese enzimática de galactooligossacarídeos com a enzima β -galactosidase foram realizadas em meio aquoso. O sistema de reação foi composto por lactose pura em tampão fosfato de sódio 0,1M (pH 7,0) e enzima, totalizando 125 mL. As quantidades adicionadas foram estabelecidas conforme o planejamento experimental proposto. Os erlenmeyers foram dispostos em incubadora rotatória, mantidos à temperatura constante conforme estabelecido no planejamento experimental, e com agitação de 180 rpm para todos os experimentos.

Foram retiradas alíquotas em intervalos de tempo pré-determinados, sendo inativadas a 100°C por 5 min, determinando-se glicose através de um kit enzimático-colorimétrico Glicose PAP Likuiform (Labtest), com leitura da absorbância a 505 nm e conversão à concentração de glicose por curva de calibração previamente determinada. A reação foi interrompida após três leituras constantes. Posteriormente, os açúcares foram determinados por cromatografia líquida de alta eficiência, utilizando um sistema HPLC – PAD (Dionex).

2.3. Planejamento Fatorial

A metodologia de superfície de resposta se baseia no método do planejamento fatorial consistindo em grupo de técnicas utilizadas para estudar as relações entre uma ou mais respostas medidas analiticamente e um número de variáveis de entrada, ou variáveis independentes que podem ser controladas. Esta ferramenta vem sendo muito utilizada nos últimos anos, principalmente em processos bioquímicos, em que muitas variáveis devem ser estudadas (RODRIGUES & IEMMA, 2005).

Neste estudo utilizou-se o planejamento fatorial para verificar quais das variáveis apresentaram efeitos significativos na produção de galactooligosacarídeos. Assim, foi estudada a influência da temperatura, concentração da enzima e concentração de lactose, obtendo-se como respostas a concentração de GOS máxima, o rendimento máximo, a produtividade máxima e a conversão máxima de lactose.

A conversão de lactose e o rendimento em GOS foram calculados de acordo com as equações 1 e 2 (HSU et al., 2007):

$$\text{Conversão de lactose (\%)} = \frac{[\text{Lac}_I (\text{g.L}^{-1}) - \text{Lac}_R (\text{g.L}^{-1})]}{\text{Lac}_I (\text{g.L}^{-1})} \times 100 \quad \text{Equação (1)}$$

$$\text{Rendimento (\%)} = \frac{\text{GOS (g.L}^{-1})}{\text{Gli + Gal + Lac + GOS (g.L}^{-1})} \times 100 \quad \text{Equação (2)}$$

Sendo GOS, Gli, Gal e Lac, respectivamente, as concentrações de galactooligosacarídeos, glicose, galactose e lactose, e os índices I e R referentes às concentrações inicial e residual, respectivamente.

A produtividade foi definida de acordo com a Equação 3, sendo expressa em $\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$.

$$\text{Produtividade (g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}) = \frac{\Delta \text{GOS (g.L}^{-1})}{\Delta \text{Tempo (h)}} \quad \text{Equação (3)}$$

O planejamento experimental proposto, com seus respectivos níveis codificados e valores reais (decodificados), está apresentado na Tabela 1, sendo utilizado o Software Statistica 6.0 (Statsoft) para o tratamento dos dados.

Os níveis propostos para cada variável foram baseados em ensaios preliminares (dados não apresentados). Nestes ensaios foi observado que concentrações de enzima menores que 5 U.mL^{-1} resultavam em tempos de reação demasiadamente elevados e que a enzima rapidamente perdia a sua atividade catalítica a 45°C , bem como em meios com pH diferentes de 7,0.

Tabela 1: Matriz do planejamento experimental 2³ com variáveis reais e codificadas.

Ensaio	Valores reais			Valores codificados		
	T (°C)	C _E (U.mL ⁻¹)	C _L (%)	Temperatura (°C)	C _E (U.mL ⁻¹)	C _L (%)
1	30	5	20	-1	-1	-1
2	40	5	20	+1	-1	-1
3	30	10	20	-1	+1	-1
4	40	10	20	+1	+1	-1
5	30	5	40	-1	-1	+1
6	40	5	40	+1	-1	+1
7	30	10	40	-1	+1	+1
8	40	10	40	+1	+1	+1
9	35	7,5	30	0	0	0
10	35	7,5	30	0	0	0
11	35	7,5	30	0	0	0

T: temperatura; C_E: concentração da enzima; C_L: concentração de lactose

2.4. Identificação e Quantificação dos Carboidratos por Cromatografia de Íons (HPLC-PAD)

2.4.1. Preparo da fase móvel

A fase móvel utilizada foi NaOH 150 mM, acetato de sódio 500mM em NaOH 150 mM e água ultra pura obtida de um sistema de purificação compacto Milli-Q Plus (Millipore). A fase móvel foi degaseificada durante 5 min com nitrogênio.

2.4.2. Curva de calibração

Para a construção da curva de calibração foram utilizados padrões de glicose, galactose e lactose (Merck). Foram preparadas as soluções contendo os três padrões, numa faixa de concentração de 1-100 mg.L⁻¹. As condições para a injeção e eluição são apresentadas a seguir. A integração dos picos para cada padrão foi otimizada com base no melhor coeficiente de regressão obtido. Utilizando-se o software de aquisição de dados Peak Net 5.1 obteve-se uma curva padrão para a quantificação das amostras.

2.4.3. Preparo das amostras

As amostras da síntese foram diluídas convenientemente para ficarem em uma faixa de concentração de 10-100 mg.L⁻¹. Para a diluição das amostras utilizou-se um diluidor automático (Diluidor-Dispenser 402, Gilson).

2.4.4. Identificação e quantificação das amostras

As amostras (25 µL) foram injetadas (Injetor automático Spectro SERIES AS 100) no sistema Dionex DX-500 (Sunnyvale, CA, USA), consistindo de uma bomba gradiente GP50 com um detector eletroquímico ED-40, operando na forma de pulso amperométrico, e um eletrodo de trabalho de ouro e eletrodo de referência Ag-AgCl. Os produtos foram analisados usando uma coluna de troca aniônica CarboPac PA1 (250X4mm) e uma pré-coluna CarboPac PA1. A temperatura foi mantida a 20-22°C e o fluxo de eluente foi de 1,0 mL. min⁻¹. O gradiente de eluição utilizado constituiu de três solventes: (A) uma solução de NaOH 150 mM, (B) uma solução de NaOH 150 mM contendo 500 mM de acetato de sódio e (C) água Milli-Q. O tempo total de corrida foi de 55 min. A eluição iniciou-se com 5% de A e 95% de C por 12 min, seguido de um gradiente linear de 100-90% do solvente A combinado ao solvente B por 23 min. Em seguida a coluna foi lavada por 5 min com 50% de B e 50% de C e equilibrada com 5% de A e 95% de C por 15 min.

A identificação e quantificação foram realizadas utilizando a curva de calibração descrita no item 2.4.2., sendo que os galactooligossacarídeos foram quantificados considerando a área relativa dos picos. Para tal foi utilizado o software de aquisição de dados Peak Net 5.1.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Síntese Enzimática de Galactooligossacarídeos

A Figura 1 apresenta os perfis cinéticos dos 11 ensaios de síntese enzimática realizados, indicando o consumo de lactose e a formação dos monossacarídeos glicose e galactose e dos galactooligossacarídeos.

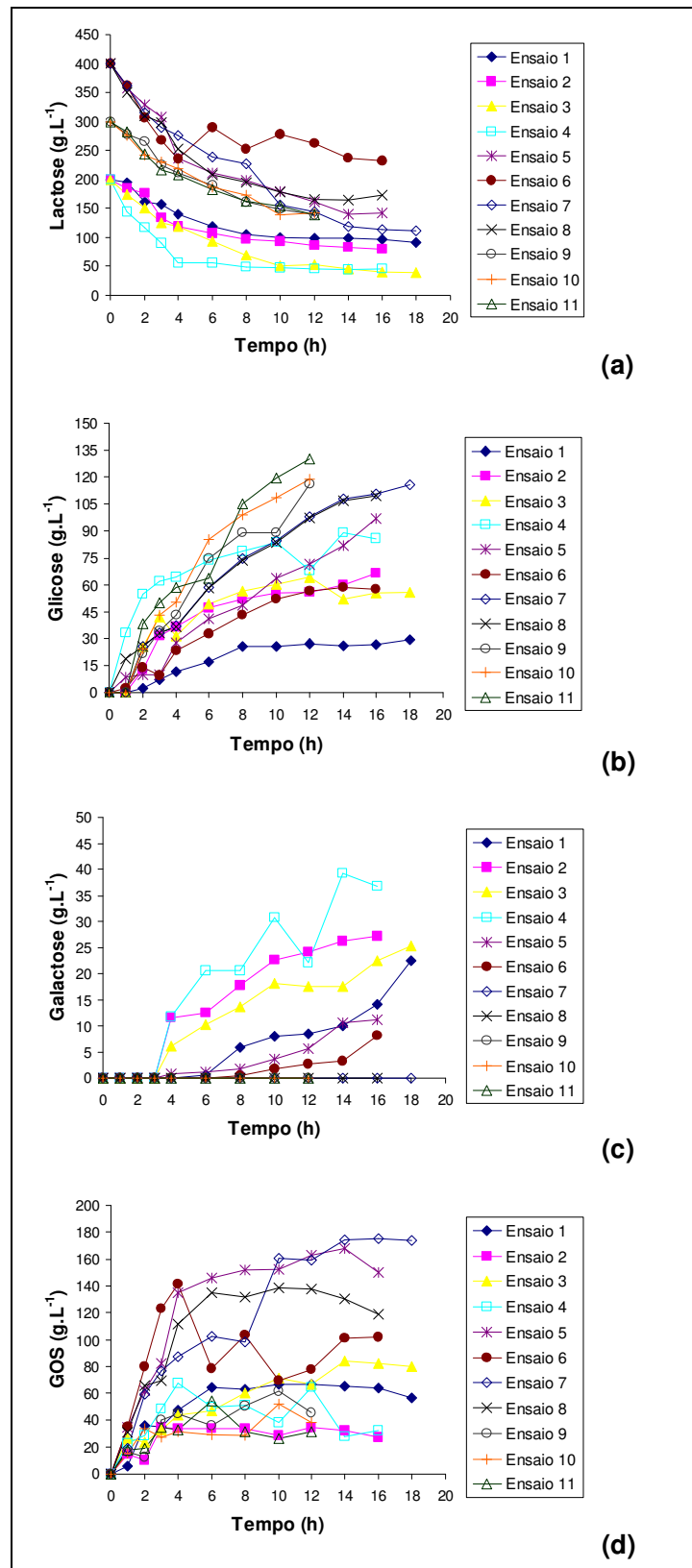


Figura 1: Concentração de açúcares durante a ação de Lactozym[®] 3000L sobre a lactose nas diferentes condições propostas no planejamento experimental.

A Figura 2 ilustra um perfil cromatográfico obtido com amostra da síntese enzimática, evidenciando os picos e respectivos tempos de retenção de galactose, glicose, lactose e galactooligossacarídeos.

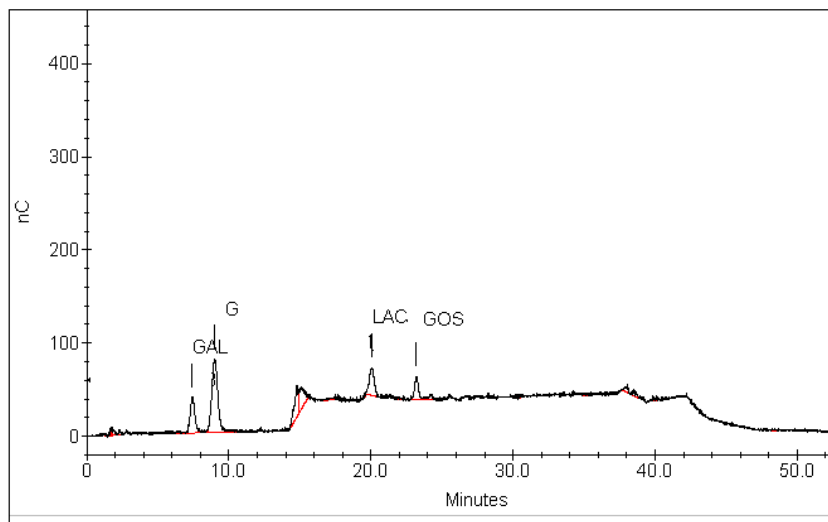


Figura 2: Perfil cromatográfico da síntese enzimática de galactooligossacarídeos utilizando como substrato lactose. Condições: 40 °C, 10 U.mL⁻¹ de enzima e 20% de lactose em 3 h de reação (ensaio 4).

Analisando as Figuras 1a a 1d, observa-se que no tempo zero de reação (adição da enzima) não foram detectadas as presenças de glicose, galactose e galactooligossacarídeos, indicando apenas a presença de lactose.

A atividade de transgalactosilação da enzima Lactozym[®] 3000L pôde ser comprovada, verificando-se a formação de galactooligossacarídeos em todas as condições testadas (Figura 1d). Foram observados picos de produção, possivelmente associados à hidrólise dos galactooligossacarídeos a monossacarídeos, conforme comentado por Del Val & Otero (2003). Desta forma é importante estabelecer o tempo de reação a fim de que se evite a perda de GOS por hidrólise.

Observa-se o acúmulo de glicose e galactose ao longo do tempo, mas esta última em menor proporção, devido ser incorporada à molécula dos galactooligossacarídeos, comportamento este observado por Chen e colaboradores (2002). Em alguns ensaios a galactose não foi detectada, podendo o fato estar associado a maior formação de GOS (ensaio 7) ou à formação de GOS associada a um menor grau de conversão da lactose (ensaios 8,9,10 e 11).

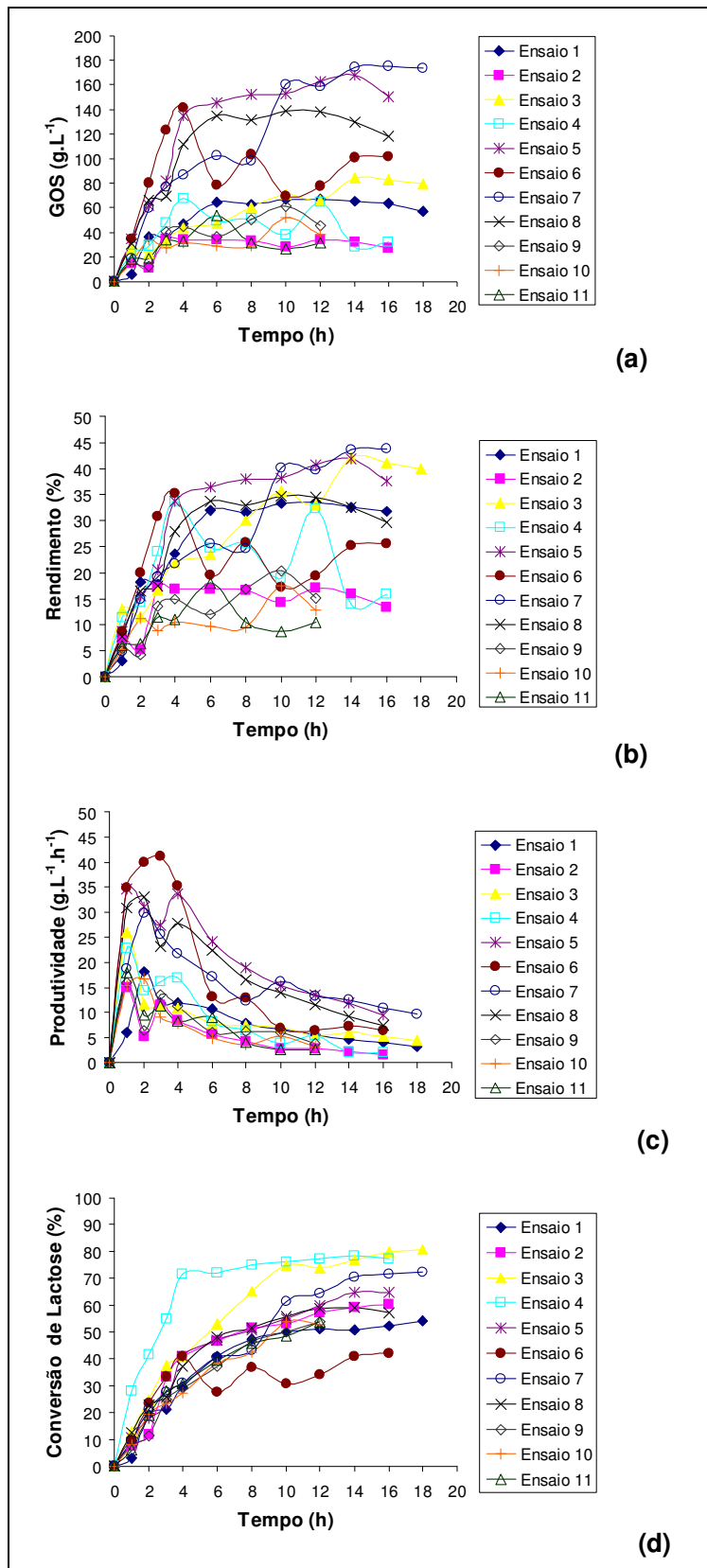


Figura 3: Concentração de GOS, rendimento, produtividade e conversão de lactose em função do tempo de reação.

A Figura 3 apresenta as respostas concentração de GOS, rendimento, produtividade e grau de conversão de lactose em função do tempo de reação.

No ensaio 7 (30°C, 10 U.mL⁻¹, 40%) conseguiu-se o maior rendimento (43,8%) e concentração de GOS (175,3 g.L⁻¹), em 16 h de reação. Para este tempo de reação as concentrações de glicose e lactose foram de, respectivamente, 110,8 g.L⁻¹ e 113,9 g.L⁻¹, não detectando-se a presença de galactose. O produto continha 43,8% de GOS, 27,7% de glicose e 28,5% de lactose, o que corresponde a uma conversão de lactose de 71,5%, podendo se considerar um resultado bastante expressivo comparado com β -galactosidases de outras fontes.

Czermak e colaboradores (2004) obtiveram um rendimento de 40% de GOS a partir de uma solução de lactose 31% com a enzima Maxilact[®] L2000 em um sistema operando em modo contínuo. Cruz e colaboradores (1999), utilizando β -galactosidase de *Penicillium simplicissimum* e concentração inicial de lactose de 60%, conseguiram 30,5% de GOS, correspondendo a uma concentração de 183 g.L⁻¹. Chen e colaboradores (2001) atingiram 31% de rendimento utilizando β -galactosidases de *Aspergillus oryzae* e concentração de lactose de 40%. Splechtna et al. (2007) conseguiram 36% de rendimento e grau de conversão de lactose de 80% usando β -galactosidase de *Lactobacillus reuteri*, para concentração inicial de lactose de 205 g.L⁻¹. Hsu e colaboradores (2007), com β -galactosidases de *Bifidobacterium longum* BCRC 157C8, atingiram 32,5% de rendimento e 59,4% de conversão de lactose utilizando solução de lactose a 40%. Rendimentos superiores, na ordem de 50%, são relatados para β -galactosidases termoestáveis, como a de *Talaromyces thermophilus* (NAKKHARAT et al., 2006).

O maior grau de hidrólise (80,5%) foi alcançado no ensaio 3 em 18 h de reação, correspondendo ao sistema reacional composto por 10 U.mL⁻¹ de enzima e 20% de lactose a 30°C. Concentrações menores de lactose levam a um menor acúmulo de glicose e galactose, que atuam como inibidores de diferentes β -galactosidases (HSU et al., 2007). Já a produtividade máxima (41,1 g.L⁻¹.h⁻¹) foi atingida no ensaio 6 (40°C, 5 U.mL⁻¹, 40%).

3.2. Influência da Temperatura, Concentração de Enzima e Concentração de Lactose

A Tabela 2 apresenta a matriz do planejamento experimental com as variáveis reais e as respostas para concentração de GOS, rendimento, produtividade e conversão de lactose, correspondentes aos valores máximos alcançados em cada ensaio.

Tabela 2: Matriz do planejamento experimental 2^3 e suas respostas.

Ensaio	T (°C)	C _E (U.mL ⁻¹)	C _L (%)	GOS (g.L ⁻¹)	Rendimento (%)	Produtividade (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	Conversão de lactose (%)
1	30	5	20	67,0	33,5	18,1	54,3
2	40	5	20	34,7	17,3	14,9	60,3
3	30	10	20	84,0	42,0	26,1	80,5
4	40	10	20	67,5	33,8	22,7	78,3
5	30	5	40	167,5	41,9	34,7	64,9
6	40	5	40	141,4	35,3	41,1	41,9
7	30	10	40	175,3	43,8	29,8	72,3
8	40	10	40	138,5	34,6	33,0	59,2
9	35	7,5	30	61,2	20,4	15,9	53,8
10	35	7,5	30	52,4	17,5	16,8	53,6
11	35	7,5	30	54,0	18,0	17,9	53,9

T: temperatura; C_E: concentração de enzima; C_L: concentração de lactose

A análise estatística dos resultados permitiu somente a obtenção dos efeitos das variáveis estudadas sobre as respostas, uma vez que não foi possível a obtenção de modelos estatisticamente significativos e preditivos.

A Figura 4 apresenta os efeitos principais e de interação para as respostas citadas.

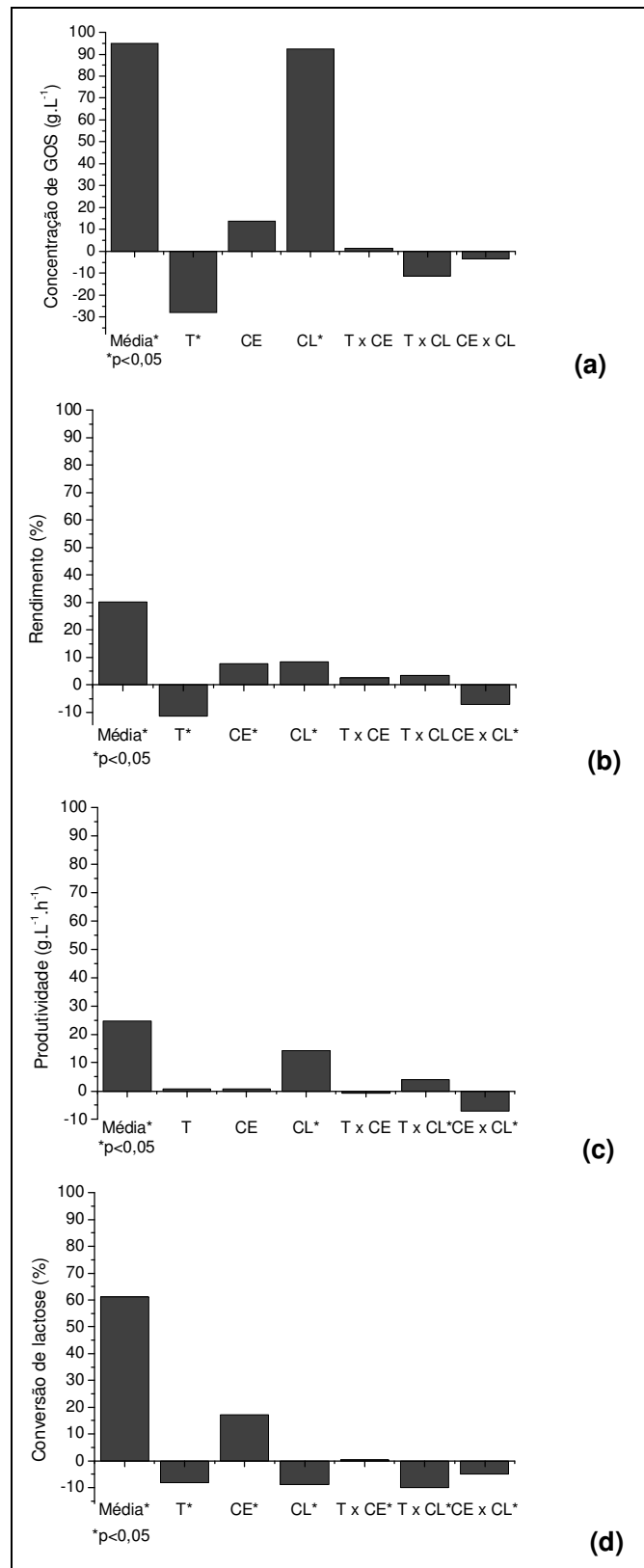


Figura 4: Efeitos principais e de interação das variáveis temperatura (T), concentração de enzima (C_E) e concentração de lactose (C_L) na concentração de GOS (a), no rendimento (b), na produtividade (c) e na conversão de lactose (d).

Na Figura 4a, pode-se observar que a concentração de lactose foi a variável que mais influenciou positivamente a resposta concentração de GOS, já que seu efeito ficou muito próximo ao da média, e a temperatura apresentou um efeito contrário. Portanto ao passar de 20% a 40% de lactose houve um incremento médio na concentração de GOS de $92,3 \text{ g.L}^{-1}$, enquanto que o aumento de 30°C para 40°C diminuiu em média $27,9 \text{ g.L}^{-1}$ a concentração de GOS.

O incremento de 5 U.mL^{-1} para 10 U.mL^{-1} de concentração de enzima bem como o aumento de 20% para 40% de concentração de lactose influenciaram o rendimento positivamente aumentando em média 7,8% e 8,5%, respectivamente, como pode-se observar na Figura 4b. No entanto, o incremento da temperatura de 30°C para 40°C bem como as interações entre a concentração de enzima e a concentração de lactose apresentaram um efeito negativo, diminuindo a resposta em média de 11,2% e 7,2%, respectivamente.

A Figura 4c apresenta o efeito das variáveis sobre a resposta produtividade. Pode-se observar que o aumento da concentração de lactose de 20% para 40%, bem como interação entre a temperatura e concentração de lactose, influenciaram positivamente a produtividade, aumentando em média $14,2 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ e $4,1 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, respectivamente. No entanto, a interação da concentração de enzima e concentração de lactose apresentaram um efeito contrário, diminuindo a resposta em média de $7,2 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$.

Pode-se observar na Figura 4d que todas as variáveis principais e suas interações tiveram efeito significativo sobre a resposta conversão de lactose. O aumento de concentração de enzima (5 U.mL^{-1} para 10 U.mL^{-1}) e a interação concentração de enzima e temperatura influenciaram positivamente a conversão de lactose, incrementando em média a resposta em 17,1% e 0,4%, respectivamente. No entanto, o aumento de 30°C para 40°C da temperatura e de 20% para 40% da concentração de lactose apresentaram um efeito negativo, diminuindo a resposta em média de 7,9% e 8,7%, respectivamente. As interações entre a temperatura e concentração de enzima, e concentração de enzima e concentração de lactose também influenciaram a resposta de maneira negativa em média de 10,1% e 4,8%.

Desta forma, pode-se afirmar que o aumento da temperatura apresentou efeito negativo sobre a resposta concentração de GOS, rendimento e conversão de lactose, possivelmente pela perda de atividade enzimática da enzima β -galactosidase, devido a sua exposição por um longo período de tempo a 40°C .

Por outro lado o aumento da concentração de lactose teve um efeito importante sobre a formação de galactooligossacarídeos. A transgalactosilação é um processo no qual a enzima β -galactosidase hidrolisa a lactose e ao invés de transferir a unidade de galactose para o grupo hidroxila da água, transfere para um composto hidroxilado que pode ser a galactose, lactose ou galactooligossacarídeos. Desta forma, 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 (HSU et al., 2007). Portanto, para aumentar a transgalactosilação maiores concentrações de lactose são requeridas, já menores concentrações desse dissacarídeo favorecem a hidrólise, levando a um maior grau de conversão. A concentração de GOS obtida é marcadamente dependente da concentração inicial de substrato.

4. CONCLUSÕES

A enzima β -galactosidase comercial de *Kluyveromyces lactis* (Lactozym® 3000L) apresentou atividade de transgalactosilação.

A reação enzimática foi sensivelmente influenciada pela temperatura e concentração de lactose, sendo que a redução da temperatura de 40 °C para 30 °C e o aumento de concentração de lactose de 20% para 40% favoreceram a reação de transgalactosilação.

O maior rendimento (43,8%) e a maior concentração de GOS (175,3 g. L⁻¹) foram obtidos quando o sistema foi composto por 40% de lactose, 10 U.mL⁻¹ de enzima a 30 °C após 16 h de reação. Nesta condição, foi obtido um produto contendo 27,7% de glicose e 28,5% de lactose.

Por outro lado a conversão máxima de lactose (80,5%) foi atingida a uma menor concentração inicial de substrato (20%), 10 U.mL⁻¹ a 30 °C.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKIYAMA, K.; TAKASE, M.; HORIKOSHI, K.; SHIGEO, O. Production of galactooligosaccharides from lactose using a β -glucosidase from *Thermus sp.* Z-1. **Bioscience, Biotechnology & Biochemistry**, v. 65, n. 2, p. 438–441, 2001.
- ALMEIDA, M. M.; PASTORE, G. M. Produção de galactooligossacarídeos por β -galactosidase utilizando metodologia de superfície de resposta. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 32, p. 10-14, 2004.

- BERGER, J. L.; LEE, B. H.; LACROIX, C. Purification, properties and characterization of a high-molecular-mass β -galactosidase isoenzyme from *Thermus aquaticus*. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 25, p. 29-41, 1997.
- CHEN, C. S.; HSU, C. K.; CHIANG, B. H. Optimization of the enzymic process for manufacturing low-lactose milk containing oligosaccharides. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 801-808, 2002.
- CHEN, S. X.; WEI, D. Z.; HU, Z. H. Synthesis of galacto-oligosaccharides in AOT/isooctane reverse micelles by β -galactosidase. **Journal of Molecular Catalisys B: Enzymatic**, v. 16, p. 109-114, 2001.
- CHOCKCHASAWASDEE, S.; AYHANASOPOULOS, V. I.; NIRANJAN, 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**, v. 89, p. 434-443, 2005.
- CRITTENDEN, 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.
- CRUZ, R.; CRUZ, V.D.; BELOTE, J.G.; KHENAYFES, M.O.; DORTA, C.; OLIVEIRA, L.H.S.; ARDILES, E.; GALLI, A. Production of transgalactosylated oligosaccharides (TOS) by galactosyltransferase activity from *Penicillium simplicissimum*. **Bioresource Technology**, v. 70, p. 165-171, 1999.
- 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.
- DEL-VAL, M. I.; OTERO, C. Biphasic aqueous media containing polyethylene glycol for the enzymatic synthesis of oligosaccharides from lactose. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 33, p. 118-126, 2003.
- 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.
- INCHAURRONDO, 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**, v. 29, p. 47-54, 1994.

- MAHONEY, R. R. Galactosyl-oligosaccharide formation during lactose hydrolysis: a review. **Food Chemistry**, v. 63, p. 147-154, 1998.
- NAKKHARAT, P.; KULBE, D. K.; YAMABHAI, M.; HALTRICH, D. Formation of galacto-oligosaccharides from the moderately thermophilic fungus *Talaromyces thermophilus*. **Biotechnology Journal**, v. 1, p. 633-638, 2006.
- RODRIGUES, I. M.; IEMMA, A. F. **Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos**. Campinas – SP: Editora Casa do Pão, 2005. 325 p.
- 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.

ARTIGO 2
BIOTRANSFORMAÇÃO DO SORO DE LEITE COM β -GALACTOSIDASE VISANDO
SEU ENRIQUECIMENTO EM GALACTOOLIGOSSACARÍDEOS

BIOTRANSFORMAÇÃO DO SORO DE LEITE COM β -GALACTOSIDASE VISANDO SEU ENRIQUECIMENTO EM GALACTOOLIGOSSACARÍDEOS**Lisboa, C. R.; Burkert, J. F. M.; Burkert, C. A. V.**

Universidade Federal do Rio Grande, Departamento de Química, Laboratório de Engenharia de Bioprocessos, Rua Eng. Alfredo Huch, 475, Rio Grande, RS, Brasil.

RESUMO

Neste estudo foi proposto um planejamento experimental 2^3 , verificando a influência da temperatura (30 - 40°C), concentração de lactose (20 - 40%) e concentração de enzima Lactozym[®] 3000L (5 - 10 U.mL⁻¹) na síntese de galactooligossacarídeos (GOS) a partir do soro de leite. Os ensaios foram conduzidos a 180 rpm, em meio aquoso e pH 7,0 (tampão fosfato de sódio 0,1 M). Os valores máximos obtidos para as respostas concentração de GOS (119,8 g.L⁻¹) e rendimento (29,9%) em 4 h de reação foram obtidos no sistema composto por 40% de lactose e 10 U.mL⁻¹ de enzima a 40°C. Nestas condições a produtividade máxima alcançada foi de 64,4 g.L⁻¹.h⁻¹ e a conversão de lactose foi de 68,7%. O máximo valor alcançado para conversão de lactose (87,8%) foi obtido nas mesmas condições de temperatura e concentração de enzima, mas com 20% de lactose. Estes resultados demonstram a capacidade da enzima Lactozym[®] 3000L em produzir galactooligossacarídeos a partir de soro de leite, obtendo um produto com 35,9 g.L⁻¹ de galactose, 119,1 g.L⁻¹ de glicose, 122,1 g.L⁻¹ de lactose e 119,8 g.L⁻¹ de GOS.

Palavras-Chaves: β -galactosidase, galactooligossacarídeos, soro de leite.

BIOTRANSFORMATION OF WHEY WITH β -GALACTOSIDASE FOR GALACTOOLIGOSACCHARIDES ENRICHMENT

Lisboa, C. R.; Burkert, J. F. M.; Burkert, C. A. V.*

Universidade Federal do Rio Grande, Departamento de Química, Laboratório de Engenharia de Bioprocessos, Rua Eng. Alfredo Huch, 475, Rio Grande, RS, Brasil.

ABSTRACT

In this study a 2³ experimental design was proposed, verifying the influence of the temperature (30 - 40 °C), lactose concentration (20 - 40%) and concentration of enzyme Lactozym[®] 3000L (5 - 10 U.mL⁻¹) on galactooligosaccharides synthesis from whey. Assays were carried out at 180 rpm, in aqueous medium and pH 7.0 (0.1 M sodium phosphate buffer). The maximum values obtained for the responses GOS concentration (119.8 g.L⁻¹) and yield (29.9%) in 4 h of process were obtained in the system composed by 40% of lactose and 10 U.mL⁻¹ of enzyme at 40°C. In these conditions the maximum productivity was 64.4 g.L⁻¹.h⁻¹ and lactose conversion was 68.7%. For lactose conversion the maximum value (87.7%) was observed at the same temperature and enzyme concentration but with lactose 20%. These results demonstrate the capacity of the enzyme Lactozym[®] 3000L in producing galactooligosaccharides from whey, obtaining a product with 35.9 g.L⁻¹ of galactose, 119.1 g.L⁻¹ of glucose, 122.1 g.L⁻¹ of lactose and 119.8 g.L⁻¹ of GOS.

Key-Words: β -galactosidase, galactooligosaccharides, whey.

1. INTRODUÇÃO

O soro de leite, subproduto da indústria de laticínios, tem na sua constituição proteínas, carboidratos, gordura e sais, correspondendo à fração aquosa do leite que se obtém durante a coagulação nos processos de produção de queijos ou caseína (GHALY et al., 2004).

Segundo a Associação Brasileira das Indústrias de Queijo (ABIQ), a produção de queijos no Brasil em 2003 foi em torno de 488 mil toneladas, o que corresponde à produção de aproximadamente 4,4 milhões de toneladas de soro de queijo, sendo o principal destino a alimentação de animais e o uso na produção industrial de biscoitos e alimentos lácteos, sendo uma parte descartada como efluente.

A imposição de controles rígidos no descarte de efluentes no meio ambiente e o reconhecimento do soro como potencial fonte de nutrientes tem

estimulado o interesse no desenvolvimento de processos comercialmente viáveis em convertê-lo em bioingrediente alimentar de maior valor agregado (BELEM & LEE, 1998).

A produção dos oligossacarídeos a partir de lactose existente no soro têm atraído a atenção dos pesquisadores e da indústria de alimentos, pelo potencial dos oligossacarídeos como ingredientes prebióticos em alimentos funcionais (RUSTOM et al., 1998).

A adição de oligossacarídeos nos alimentos promove modificações no “flavour” e nas características físico-químicas, e muitos desses açúcares possuem propriedades que beneficiam a saúde de seus consumidores. O principal interesse na produção de oligossacarídeos não se encontra particularmente em seu uso como adoçante alternativo, mas sim no estímulo à produção de bifidobactérias, com os seguintes efeitos benéficos: manutenção normal da microflora intestinal, maior tolerância à lactose, atividade anti-cancerígena, estímulo do sistema imunológico, melhora do valor nutricional dos alimentos, entre outros (CRITTENDEN & PLAYNE, 1996).

A enzima β -galactosidase (EC 3.2.1.23), amplamente utilizada para a produção de lácteos com baixo teor de lactose, catalisa não somente reações de hidrólise de β -galactopiranosídeos e lactose, mas também reações de transgalactosilação para a produção de oligossacarídeos (ONISHI & TANAKA, 1995).

A reação de transgalactosilação na formação de galactooligossacarídeos (GOS) ocorre pela transferência do resíduo de açúcar que forma a porção glicona da molécula do substrato para outra molécula de lactose. Quando a transferência é feita para a água, a reação é de hidrólise (AKIYAMA et al., 2001).

O objetivo principal deste trabalho foi estudar a influência da temperatura, concentração de enzima e concentração de lactose na obtenção de galactooligossacarídeos tendo como substrato o soro de leite, utilizando a enzima β -galactosidase comercial de *Kluyveromyces lactis* (Lactozym[®] 3000L), visando estabelecer condições para a produção de um soro contendo GOS e que possa ser utilizado como ingrediente alimentar potencialmente prebiótico.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Enzima

A enzima utilizada foi a β -galactosidase comercial de *Kluyveromyces lactis* Lactozym[®] 3000L (3263,19 U.mL⁻¹), gentilmente cedida pela Novozymes. Uma

unidade de β -galactosidase é definida como a quantidade de enzima que libera 1 μ mol de o-nitrofenol por minuto nas condições do ensaio (INCHAURRONDO et al., 1994).

2.2. Soro de Leite

Foi utilizado soro de leite desidratado, disponibilizado pela Cooperativa Sul-Riograndense de Laticínios (COSULATI), Pelotas, Rio Grande do Sul. O soro de leite foi armazenado a 4 °C até o momento de sua utilização.

2.3. Caracterização do Soro de Leite

Retirou-se uma amostra representativa do soro de leite desidratado para análises de proteína, umidade, minerais e gordura. Os carboidratos foram determinados por diferença. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

2.3.1. Proteína

Foi utilizado o método de Kjeldahl, segundo metodologia descrita pela AOAC (1995). O fator de conversão utilizado foi de 6,38.

2.3.2. Umidade

Para determinação da umidade presente na amostra, deixou-se a mesma em estufa a 105 °C até peso constante (AOAC, 1995).

2.3.3. Minerais

O método utilizado fundamenta-se na perda de massa que ocorre quando o produto é calcinado a 500-550 °C, com a destruição da matéria orgânica, sem decomposição dos constituintes do resíduo mineral ou perda por volatilização (AOAC, 1995).

2.3.4. Gordura

Foi utilizado o método de Roesse-Gottlieb recomendado para análise de lipídios presentes em leite (AOAC, 1995).

2.4. Síntese de Galactooligossacarídeos

As reações de síntese enzimática de galactooligossacarídeos com a enzima β -galactosidase Lactozym[®] 3000L foram realizadas sob agitação constante, em meio aquoso. O sistema de reação foi composto por soro de leite, re-hidratado em tampão fosfato de sódio 0,1 M (pH 7,0), e a enzima líquida, totalizando 125 mL. As quantidades adicionadas foram estabelecidas conforme o planejamento experimental proposto. Os erlenmeyers foram dispostos em incubadora rotatória, mantidos à

temperatura constante conforme estabelecido no planejamento experimental, e agitação foi mantida em 180 rpm para todos os experimentos.

Foram retiradas alíquotas em intervalos de tempo pré-determinados, sendo inativadas a 100°C por 5 min, determinando-se glicose através de um kit enzimático-colorimétrico Glicose PAP Likuiform (Labtest), com leitura da absorbância a 505 nm e conversão à concentração de glicose por curva de calibração previamente determinada. A reação foi interrompida após três leituras constantes. Posteriormente, os açúcares foram determinados por cromatografia líquida de alta eficiência, utilizando um sistema HPLC – PAD (Dionex).

2.5. Planejamento Fatorial

A metodologia de superfície de resposta se baseia no método do planejamento fatorial consistindo em um grupo de técnicas utilizadas para estudar as relações entre uma ou mais respostas medidas analiticamente e um número de variáveis de entrada, ou variáveis independentes, que podem ser controladas. Esta ferramenta vem sendo muito utilizada nos últimos anos, principalmente em processos bioquímicos onde muitas variáveis devem ser estudadas (RODRIGUES & IEMMA, 2005).

Neste estudo utilizou-se o planejamento fatorial para verificar quais das variáveis apresentaram efeitos significativos na produção de galactooligosacarídeos. Assim, foi estudada a influência da temperatura, da concentração da enzima e da concentração de lactose, obtendo-se como respostas a concentração de GOS máxima, o rendimento máximo, a produtividade máxima e a conversão máxima de lactose.

A conversão de lactose e o rendimento em GOS foram calculados de acordo com as equações 1 e 2 (HSU et al., 2007):

$$\text{Conversão de lactose (\%)} = \frac{[\text{Lac}_i (\text{g.L}^{-1}) - \text{Lac}_R (\text{g.L}^{-1})]}{\text{Lac}_i (\text{g.L}^{-1})} \times 100 \quad \text{Equação (1)}$$

$$\text{Rendimento (\%)} = \frac{\text{GOS (g.L}^{-1})}{\text{Gli + Gal + Lac + GOS (g.L}^{-1})} \times 100 \quad \text{Equação (2)}$$

Sendo GOS, Gli, Gal e Lac, respectivamente, as concentrações de galactooligossacarídeos, glicose, galactose e lactose, e os índices I e R referentes às concentrações inicial e residual, respectivamente.

A produtividade foi definida de acordo com a Equação 3, sendo expressa em $\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$.

Equação (3)

$$\text{Produtividade } (\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}) = \frac{\Delta \text{GOS } (\text{g.L}^{-1})}{\Delta \text{Tempo } (\text{h})}$$

O planejamento experimental proposto, com seus respectivos níveis codificados e valores reais (decodificados), está apresentado na Tabela 1.

Tabela 1: Matriz do planejamento experimental 2^3 com variáveis reais e codificadas

Ensaio	Valores reais			Valores codificados		
	T (°C)	C _E (U.mL ⁻¹)	C _L (%)	T (°C)	C _E (U.mL ⁻¹)	C _L (%)
1	30	5	20	-1	-1	-1
2	40	5	20	+1	-1	-1
3	30	10	20	-1	+1	-1
4	40	10	20	+1	+1	-1
5	30	5	40	-1	-1	+1
6	40	5	40	+1	-1	+1
7	30	10	40	-1	+1	+1
8	40	10	40	+1	+1	+1
9	35	7,5	30	0	0	0
10	35	7,5	30	0	0	0
11	35	7,5	30	0	0	0

T: temperatura; C_E: concentração da enzima; C_L: concentração de lactose

2.6. Identificação e Quantificação dos Carboidratos por Cromatografia de Íons (HPLC-PAD)

2.6.1. Preparo da fase móvel

A fase móvel utilizada foi NaOH 150 mM, acetato de sódio 500 mM em NaOH 150 mM e água ultra pura obtida de um sistema de purificação compacto Milli-Q Plus (Millipore). A fase móvel foi desgaseificada durante 5 min com nitrogênio.

2.6.2. Curva de calibração

Para a construção da curva de calibração foram utilizados padrões de glicose, galactose e lactose (Merck). Foram preparadas as soluções contendo os três padrões, numa faixa de concentração de 1-100 mg.L⁻¹. As condições para a injeção e eluição são apresentadas a seguir. A integração dos picos para cada padrão foi otimizada com base no melhor coeficiente de regressão obtido. Utilizando-se o software de aquisição de dados Peak Net 5.1 obteve-se uma curva padrão para a quantificação das amostras.

2.6.3. Preparo das amostras

As amostras da síntese foram diluídas convenientemente para ficarem em uma faixa de concentração de 10-100 mg.L⁻¹. Para a diluição das amostras utilizou-se um diluidor automático (Diluidor-Dispenser 402, Gilson).

2.6.4. Identificação e quantificação das amostras

As amostras (25 µL) foram injetadas (injetor automático Spectro SERIES AS 100) no sistema Dionex DX-500 (Sunnyvale, CA, USA), consistindo de uma bomba gradiente GP50 com um detector eletroquímico ED-40, operando na forma de pulso amperométrico, e um eletrodo de trabalho de ouro e eletrodo de referência Ag-AgCl. Os produtos foram analisados usando uma coluna de troca aniônica CarboPac PA1 (250X4mm) e uma pré-coluna CarboPac PA1. A temperatura foi mantida a 20-22°C e o fluxo de eluente foi de 1,0 mL.min⁻¹. O gradiente de eluição utilizado constituiu de três solventes: (A) uma solução de NaOH 150 mM, (B) uma solução de NaOH 150 mM contendo 500 mM de acetato de sódio e (C) água Milli-Q. O tempo total de corrida foi de 55 min. A eluição iniciou-se com 5% de A e 95% de C por 12 min, seguido de um gradiente linear de 100-90% do solvente A combinado ao solvente B por 23 min. Em seguida a coluna foi lavada por 5 min com 50% de B e 50% de C e equilibrada com 5% de A e 95% de C por 15 min.

A identificação e quantificação foram realizadas utilizando padrões comerciais, com auxílio do software de aquisição de dados Peak Net 5.1.

Os níveis propostos para cada variável foram baseados em ensaios preliminares (dados não apresentados). Nestes ensaios foi observado que concentrações de enzima menores que 5 U.mL⁻¹ resultavam em tempos de reação demasiadamente elevados e que a enzima rapidamente perdia a sua atividade catalítica a 45 °C, bem como em meios com pH diferentes de 7,0.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Caracterização do Soro de Leite

Na Tabela 2 é apresentada a composição média do soro de leite utilizado neste estudo. Os carboidratos foram calculados por diferença, considerando o valor obtido como lactose, a fim de calcular a quantidade de soro necessária para a concentração de lactose desejada.

Tabela 2: Composição do soro de leite desidratado.

Componente	Composição (%)*
Proteína	10,41 ± 0,47
Umidade	4,67 ± 0,04
Minerais	8,26 ± 0,07
Gordura	2,32 ± 0,06
Carboidratos	74,3 ± 0,06

* médias e desvios padrão

De acordo com o Codex Alimentarius (2006) o soro de leite em pó deve apresentar 2% de gordura, no mínimo 10% de proteína e, no máximo, 5% de umidade e 9,5% de cinzas. Desta forma, o soro utilizado apresentou composição dentro de esperado.

3.2. Síntese de Galactooligossacarídeos a Partir do Soro de Leite

A Figura 1 apresenta os perfis cinéticos dos 11 ensaios de síntese enzimática realizados, indicando o consumo de lactose e a formação dos monossacarídeos glicose e galactose e dos galactooligossacarídeos. A Figura 2 ilustra um perfil cromatográfico típico.

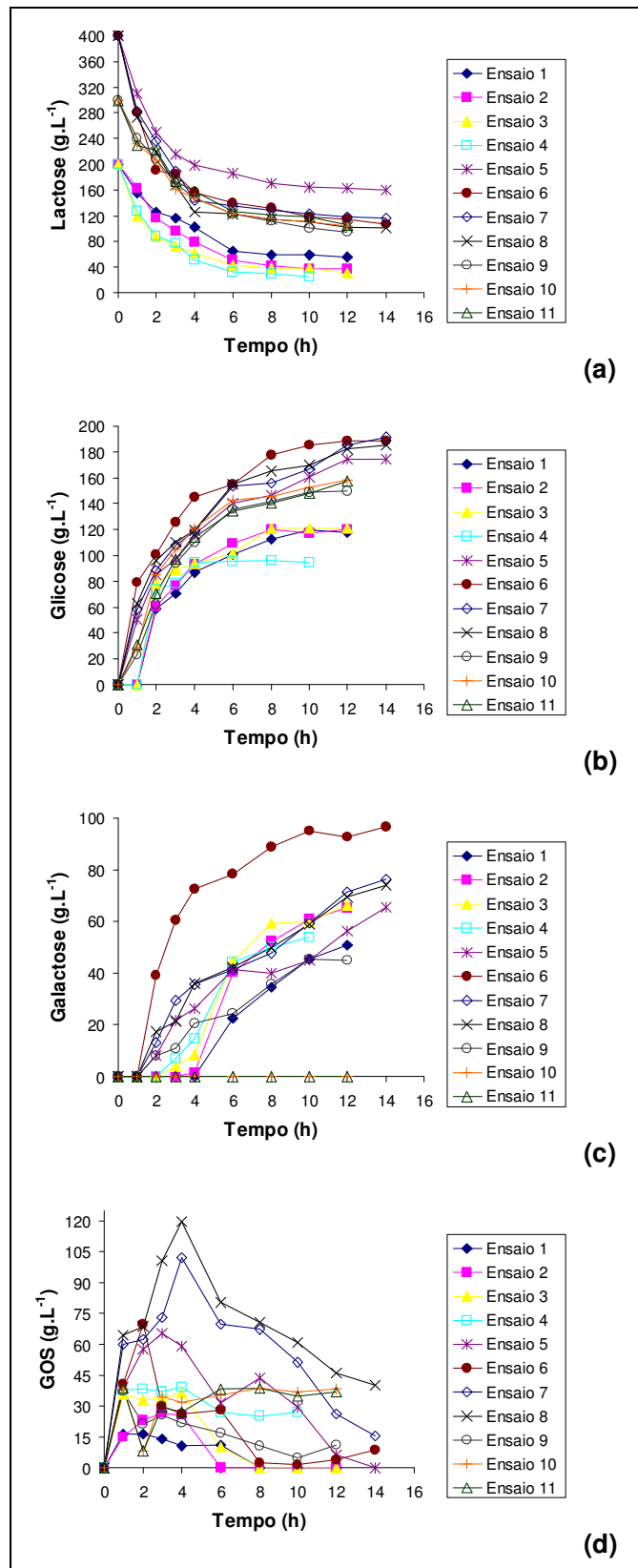


Figura 1: Concentração de açúcares durante a conversão de lactose, utilizando como substrato soro de leite .

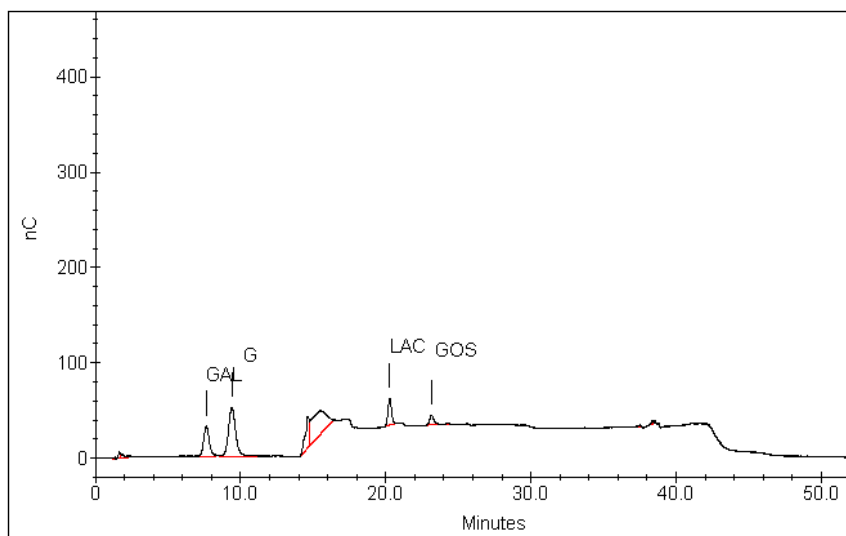


Figura 2: Perfil cromatográfico na síntese enzimática de galactooligosacarídeos utilizando como substrato soro de leite. Condições: 40 °C, 10 U.mL⁻¹, 20% lactose, t = 2 h (ensaio 4).

Analisando as Figuras 1a a 1d, observa-se que no tempo zero de reação não foram detectadas as presenças de glicose, galactose e galactooligosacarídeos, indicando apenas a presença de lactose.

Em todos os ensaios houve a formação de galactooligosacarídeos (Figura 1d), comprovando a atividade de transgalactosilação da enzima Lactozym[®] 3000L. No entanto, observa-se em geral um pico de galactooligosacarídeos, relacionado ao fato de que posteriormente ocorre a hidrólise dos oligossacarídeos formados. Del Val & Otero (2003) comentam que a hidrólise dos oligossacarídeos compete com a reação de transgalactosilação. Desta forma, a fim de maximizar a produção de GOS, é essencial estabelecer o tempo de reação para uma dada condição reacional. Os picos em geral ocorrem quando uma boa parte da lactose já foi hidrolisada (59,2 – 87,8%), mas não coincide com a conversão máxima da lactose.

Também, observa-se que à medida que a concentração de lactose decresce (Figura 1a), as concentrações de glicose e galactose aumentam com o tempo (Figuras 1b e 1c). Contudo, o conteúdo de galactose é expressivamente menor, pois a galactose é usada na formação de galactooligosacarídeos. Os galactooligosacarídeos são formados por duas ou mais unidades de galactose (4'galactosil-lactose) e por apenas uma unidade de glicose (OHTSUOKA et al., 1989).

A Figura 3 apresenta as respostas concentração de GOS, rendimento, produtividade e grau de conversão da lactose, calculados ao longo do tempo de reação.

A condição para a máxima concentração de GOS ($119,8 \text{ g.L}^{-1}$), correspondente ao ensaio 8 (40°C , 10 U.mL^{-1} , 40%), implica em maior rendimento (29,9%), obtido após 4 h de reação (Figura 3b). Neste tempo o grau de conversão da lactose foi de 68,7% (Figura 3d), obtendo-se um produto com $125,1 \text{ g.L}^{-1}$ de lactose, $119,1 \text{ g.L}^{-1}$ de glicose e $35,9 \text{ g.L}^{-1}$ de galactose.

Por outro lado a conversão máxima de lactose (87,8%) foi obtida no ensaio 4 (40°C , 10 U.mL^{-1} , 20%), indicativo de que a reação de hidrólise é favorecida em menores concentrações de lactose, sendo a reação de transgalactosilação desfavorecida. Estes resultados estão em concordância com aqueles obtidos com a enzima Maxilact[®] L2000 por Foda & Lopez-Leiva (2000), que observaram um aumento no grau de hidrólise de 87,0% para 92,9% quando diminuiu a concentração de lactose no permeado de soro de 20% para 14%.

Rustom et al (1998), utilizando permeado de soro de leite obtido por ultrafiltração (23% de lactose), a 45°C , pH 7 e 0,1% de Lactozym[®] 3000L, alcançaram rendimento de 23,5%, correspondendo a uma concentração de 5,4% de oligossacarídeos, e grau de hidrólise de 69,5%. Chen e colaboradores (2002), utilizando permeado de soro de leite obtido por ultrafiltração, conseguiram, para concentração inicial de lactose de 25,3%, um produto com 31,1% de oligossacarídeos.

Os resultados quanto ao rendimento e composição do produto foram bastante expressivos, principalmente considerando que trabalhou-se com soro de leite "in natura", cujas proteínas e minerais podem ter efeito inibitório sobre a atividade da enzima e conseqüente formação de oligossacarídeos. Chen e colaboradores (2002) comentam que o mecanismo de inibição causado pelas proteínas do leite é ainda desconhecido, mas constitui a principal causa da baixa produção de oligossacarídeos no leite e soro, e que cátion como Mg^{+2} , Ca^{+2} , Zn^{+2} e Na^+ podem ativar ou inibir a enzima, dependendo da sua origem. Rustom e colaboradores (1998) comentam que a atividade da lactase de *Kluyveromyces lactis* é inibida pela presença de Ca^{+2} e Na^+ .

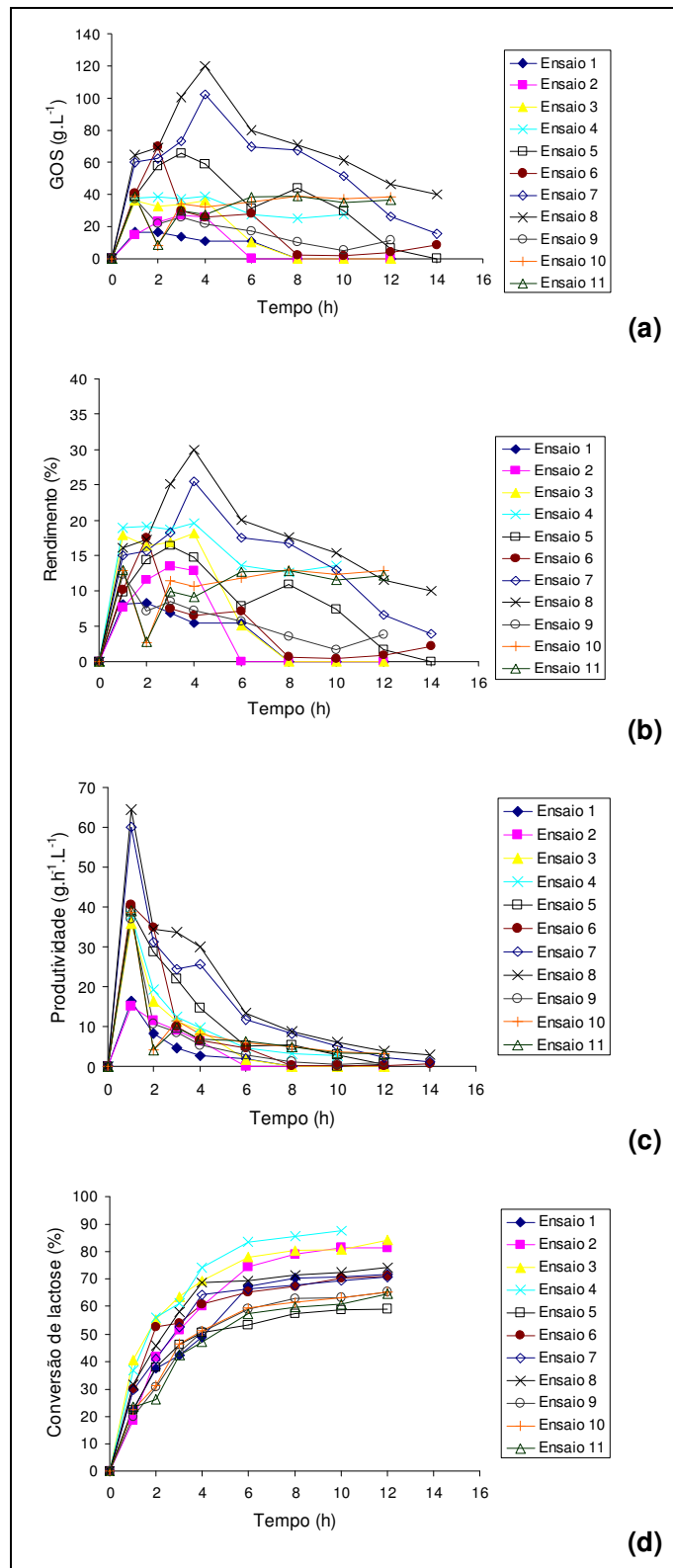


Figura 3: Concentração de GOS, rendimento, produtividade e conversão de lactose ao longo do tempo de reação.

A produtividade, em geral, atingiu valores máximos no início de síntese enzimática (1-4 h), decrescendo em seguida. Este comportamento reflete o fato de que glicose e galactose, ao atingirem certo nível de concentração, atuam como inibidores para a formação de oligossacarídeos a partir da lactose, conforme sugerido por Rustom et al. (1998).

3.3. Planejamento Experimental e Análise de Superfície de Resposta

Foi avaliado o efeito das variáveis temperatura, concentração de enzima e concentração de lactose na produção de galactooligossacarídeos através de um planejamento experimental 2^3 . A Tabela 3 apresenta a matriz do planejamento experimental com valores reais e as respostas concentração de GOS máxima, rendimento de GOS máximo, conversão de lactose máxima e produtividade máxima.

Tabela 3: Matriz do planejamento experimental 2^3 e suas respostas.

Ensaio	T (°C)	C _E (U.mL ⁻¹)	C _L (%)	GOS (g.L ⁻¹)	Rendimento (%)	Produtividade (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	Conv. de lactose (%)
1	30	5	20	16,5	8,2	16,4	71,9
2	40	5	20	26,9	13,4	15,1	81,5
3	30	10	20	36,3	18,1	35,8	84,3
4	40	10	20	39,0	19,1	37,8	87,8
5	30	5	40	65,6	16,4	39,2	59,2
6	40	5	40	69,9	17,5	40,6	71,2
7	30	10	40	102,0	25,5	60,1	70,7
8	40	10	40	119,8	29,9	64,4	74,3
9	35	7,5	30	37,1	12,4	37,1	65,2
10	35	7,5	30	38,8	12,9	38,6	65,4
11	35	7,5	30	38,9	12,9	38,9	64,7

T: temperatura; C_E: concentração de enzima; C_L: concentração de lactose.

3.3.1. Concentração de GOS

Na Figura 4 estão apresentados os efeitos para a resposta concentração de GOS. Verifica-se que a concentração de lactose foi a variável que mais influenciou positivamente ($p > 0,05$) a resposta, já que seu efeito atingiu valor superior ao da média. O incremento de 30°C para 40°C na temperatura e de 5 U.mL⁻¹ para 10 U.mL⁻¹ na concentração de enzima influenciaram a concentração de GOS positivamente, aumentando em média 9 g.L⁻¹ e 30 g.L⁻¹, respectivamente. A interação entre as variáveis concentração de enzima e concentração de lactose também apresentou efeito significativo e positivo ($p < 0,05$), em média de 12%.

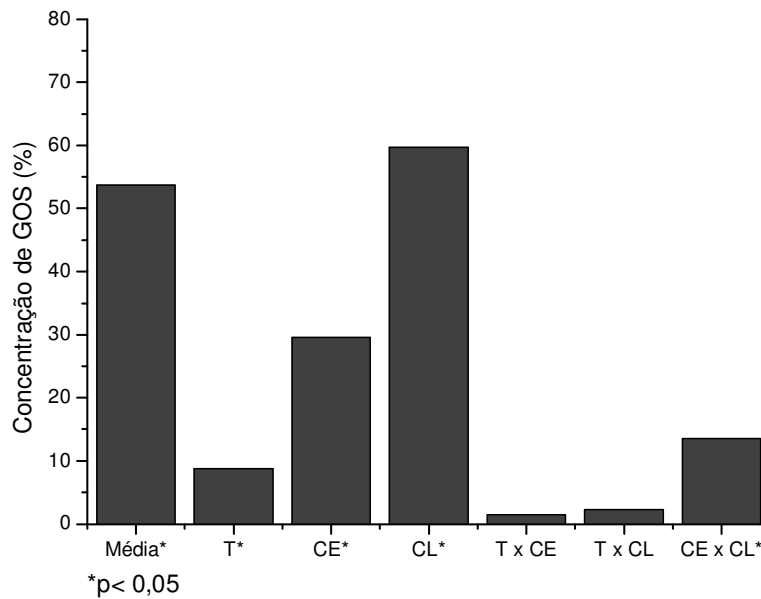


Figura 4: Efeitos principais e de interação das variáveis temperatura, concentração de enzima e concentração de lactose na concentração de GOS.

Os dados obtidos no planejamento experimental foram tratados no Software Statistica 6.0 permitindo a obtenção de modelo matemático linear de primeira ordem codificado, conforme a Equação 4, que descreve a resposta concentração de GOS, em função das variáveis independentes significativas ($p < 0,05$).

$$\text{GOS} = 53,70 + 14,78 C_E + 4,41T + 29,83 C_L + 6,80 C_L \times C_E$$

Equação (4)

Onde:

T= Temperatura;

C_E = Concentração de enzima;

C_L = Concentração de lactose;

O modelo foi validado pela análise de variância (ANOVA), apresentada na Tabela 4.

Tabela 4: Análise de variância para concentração de GOS .

Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F calculado
Regressão	9390,53	4	2347,63	13,35
Resíduo	1054,65	6	175,77	
Erro puro	2,07	2		
F ajuste	1052,58	4		
Total	10445,18	10		

$$R = 0,95; F_{(0,95; 4,6)} = 4,53$$

Verifica-se na Tabela 4 que o coeficiente de correlação obtido para concentração de GOS foi de 0,95 e o F calculado foi 2,95 vezes maior que o valor tabelado, permitindo validar estatisticamente o modelo ($p < 0,05$).

A partir do modelo obtido foi possível obter as superfícies de resposta e curvas de contorno para estabelecer as melhores condições de concentração de lactose, concentração de enzima e temperatura que proporcionam o maior valor de concentração de GOS. As superfícies de resposta e curvas de contorno estão apresentadas na Figura 5.

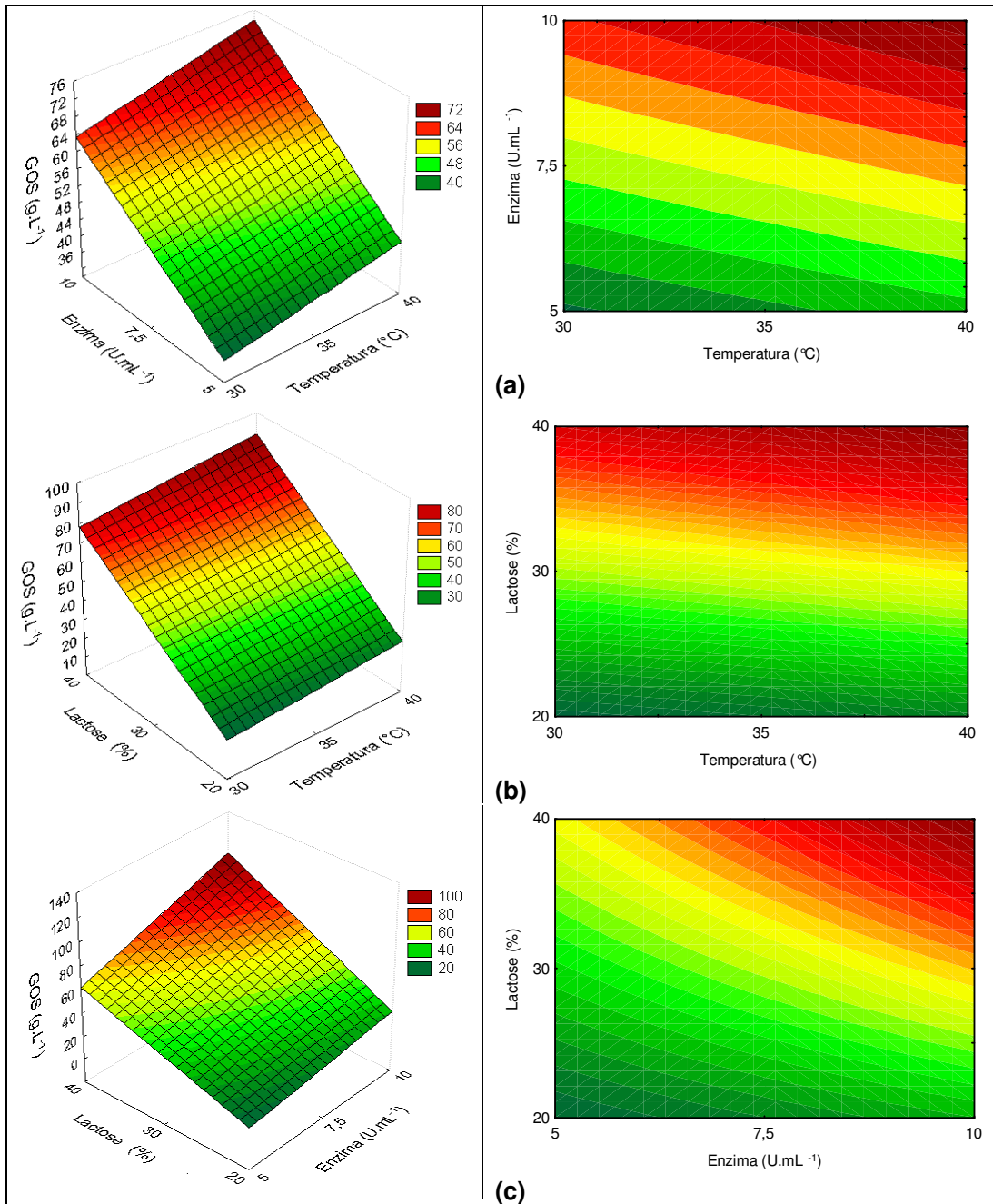


Figura 5: Superfícies de resposta e curvas de contorno para a concentração de GOS: (a) Concentração de enzima x temperatura (concentração de lactose a 30%); (b) Concentração de lactose x temperatura (concentração de enzima a 7,5 U.mL⁻¹); e (c) Concentração de lactose x concentração de enzima (temperatura a 35°C).

Na Figura 5a pode-se verificar que com o incremento da concentração de enzima nos diferentes níveis de temperaturas avaliados houve um aumento da concentração de GOS. Comportamento similar foi observado com a variável

temperatura. As máximas concentrações alcançadas nesta superfície foram a 40°C e 10 U.mL⁻¹, atingindo cerca de 72 g.L⁻¹ de GOS.

O aumento na concentração de lactose inicial proporcionou um incremento na concentração de GOS para toda a faixa de temperatura estudada, como pode se observar na Figura 5b, atingindo aproximadamente 80 g.L⁻¹ de GOS quando a lactose estava a 40% e a temperatura a 40°C.

Na Figura 5c observa-se que o incremento da concentração de enzima proporcionou um aumento mais significativo na concentração de GOS em altas concentrações de lactose. Comportamento similar foi observado também para a variável concentração de lactose. Aproximadamente 100 g.L⁻¹ de GOS foi alcançado com 10 U.mL⁻¹ de enzima e 40% de lactose. Portanto, a melhor condição que propicia uma maior concentração de GOS é 10 U.mL⁻¹ de enzima, 40% de concentração de lactose a 40°C.

3.3.2. Rendimento

A Figura 6 apresenta os efeitos das variáveis sobre o rendimento de galactooligosacarídeos.

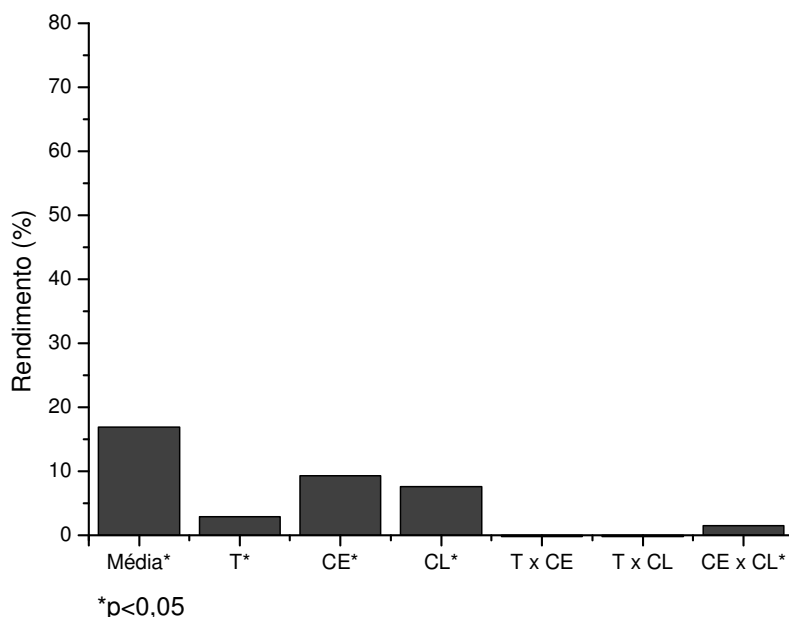


Figura 6: Efeitos principais e de interação das variáveis temperatura, concentração de enzima e concentração de lactose no rendimento.

Podemos observar na Figura 6 que o aumento da temperatura, concentração de enzima e concentração de lactose tiveram um efeito positivo e significativo sobre a resposta ($p < 0,05$), aumentando em média 2,9%, 9,3% e 7,6%, respectivamente. O mesmo comportamento pode ser observado na interação entre as variáveis concentração de enzima e concentração de lactose, onde o rendimento foi influenciado positivamente, aumentando em média 1,5%.

Os dados obtidos no planejamento experimental para a resposta rendimento foram tratados estatisticamente permitindo a obtenção de modelo matemático linear codificado de primeira ordem, conforme a Equação 5, que descreve a resposta rendimento, em função das variáveis independentes.

$$\text{Rendimento (\%)} = 16,95 + 4,65 C_E + 1,47 T + 3,80C_L + 0,75 C_L \times C_E \quad \text{Equação (5)}$$

Onde:

T= Temperatura;

C_E = Concentração de enzima;

C_L = Concentração de lactose.

O modelo foi validado pela análise de variância (ANOVA), apresentada na Tabela 5.

Tabela 5: Análise de variância para o rendimento.

Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F calculado
Regressão	309,59	4	77,40	5,73
Resíduo	81,06	6	13,51	
Erro puro	0,20	2		
F ajuste	80,86	4		
Total	390,64	10		

$$R = 0,89; F_{(0,95; 4,6)} = 4,53$$

Para a resposta rendimento apresentada na Tabela 5 o coeficiente de correlação foi de 0,89 e o F calculado foi 1,27 vezes maior que o valor tabelado. Apesar de não ser o mais indicado, igualmente foi obtido um modelo matemático para a avaliação das superfícies.

A partir do modelo, foi então possível obter as superfícies de resposta e curvas de contorno para estabelecer as melhores condições para a produção de GOS,

a fim de se obter máximo rendimento. As superfícies de resposta e curvas de contorno estão apresentadas na Figura 7.

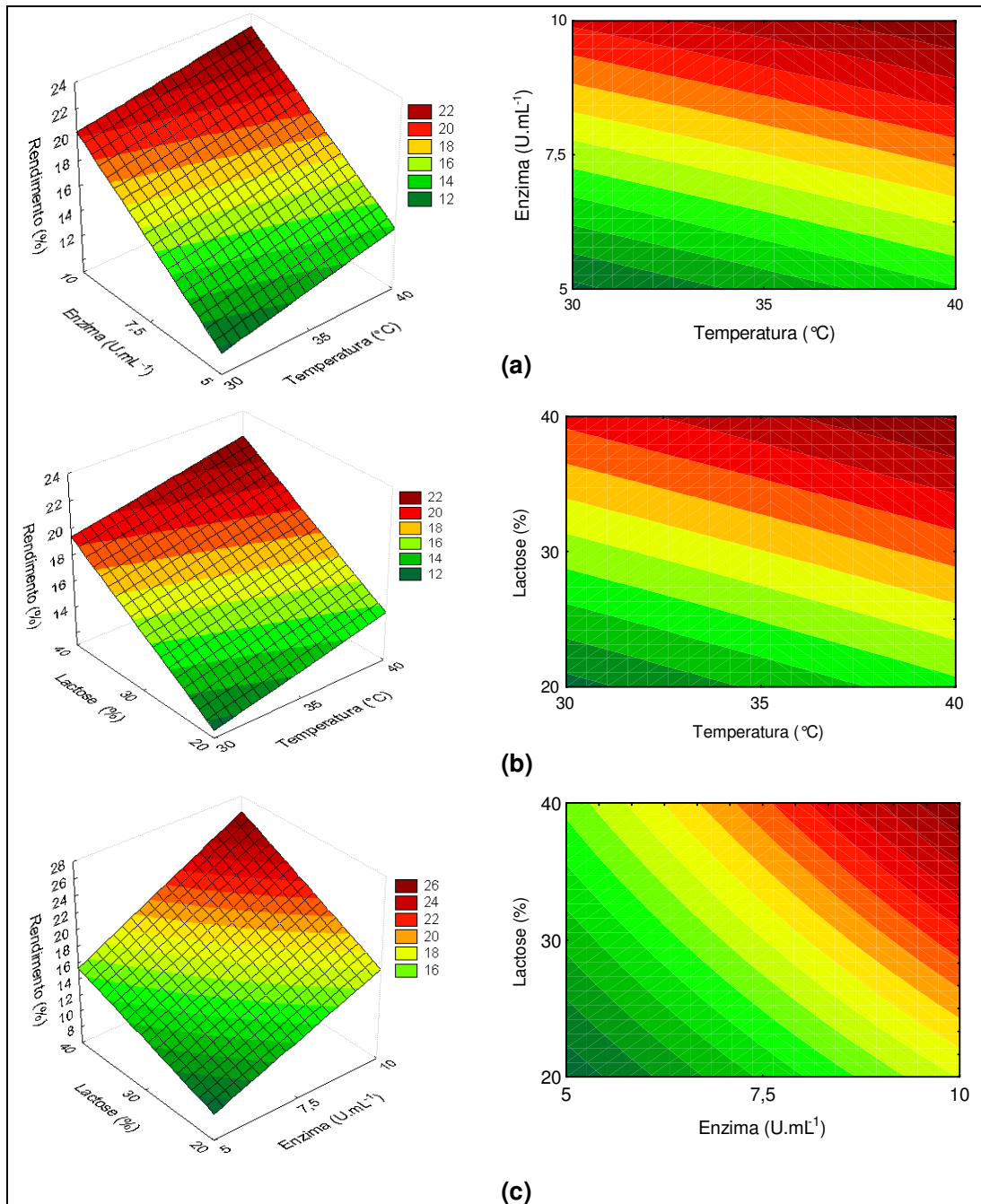


Figura 7: Superfícies de resposta e curvas de contorno para o rendimento: (a) Concentração de enzima x temperatura (concentração de lactose a 30%); (b) Concentração de lactose x temperatura (concentração de enzima a 7,5 U.mL⁻¹); e (c) Concentração de lactose x concentração de enzima (temperatura a 35°C).

Analisando a superfície de resposta, conforme mostra a Figura 7a, pode-se verificar que com o aumento da concentração de enzima de 5 U.mL^{-1} para 10 U.mL^{-1} nos diferentes níveis de temperatura avaliados gerou um aumento no rendimento, ocorrendo o mesmo com o incremento da temperatura. O máximo valor de rendimento alcançado foi observado quando o sistema foi composto pela máxima concentração de enzima (10 U.mL^{-1}) e máxima temperatura (40°C), atingindo aproximadamente 23%.

O incremento da concentração de lactose gerou um aumento do rendimento para toda a faixa de temperatura estudada, como pode ser observado na Figura 7b, e quando o sistema reacional é composto por 40°C de temperatura e 40% de lactose o rendimento atinge valor máximo de aproximadamente 22%.

Na Figura 7c verifica-se que o incremento da concentração de lactose proporcionou um aumento mais significativo no rendimento em altas concentrações de enzima. Comportamento similar também foi observado para a concentração de enzima. A resposta rendimento pode chegar a 27% quando utiliza-se 40% de lactose e 10 U.mL^{-1} de enzima.

Portanto, a condição estudada que proporcionou o maior rendimento foi 10 U.mL^{-1} de enzima, 40% de lactose a 40°C .

3.3.3. Produtividade

Na Figura 8 pode-se verificar que as variáveis concentração de enzima e concentração de lactose apresentaram efeito estatisticamente significativo ($p < 0,05$) incrementando a produtividade. O aumento da concentração da enzima de 5 U.mL^{-1} para 10 U.mL^{-1} , e da concentração de lactose de 20% para 40%, influenciaram positivamente a produtividade, aumentando em média $21,7 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ e $24,8 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, respectivamente.

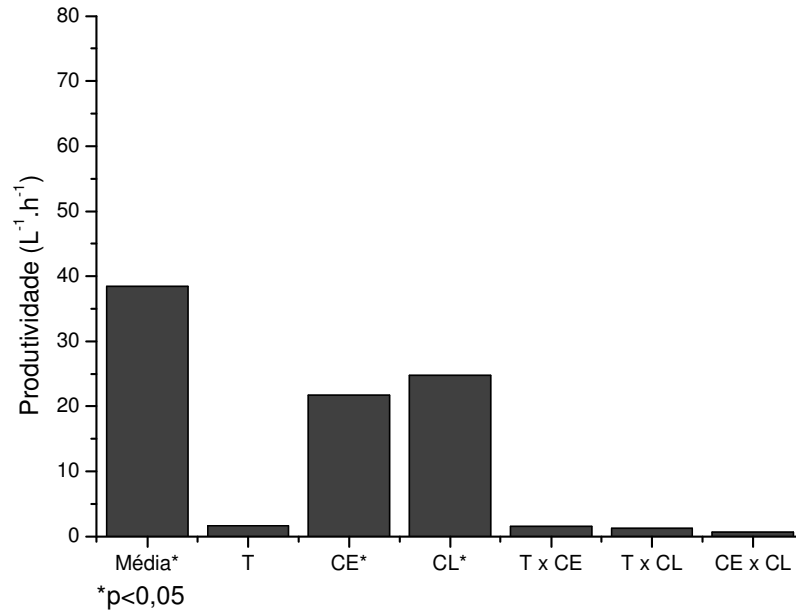


Figura 8: Efeitos principais e de interação das variáveis temperatura, concentração de enzima e concentração de lactose na produtividade.

Os dados obtidos no planejamento experimental para produtividade foram tratados, permitindo a obtenção de modelo matemático linear de primeira ordem, conforme a Equação 6, que descreve a resposta produtividade em função das variáveis independentes.

$$\text{Produtividade (g.L}^{-1}\text{.h}^{-1}\text{)} = 38,52 + 10,85 C_E + 12,40 C_L \quad \text{Equação (6)}$$

Onde:

C_E = Concentração de enzima;

C_L = Concentração de lactose.

O modelo foi validado pela análise de variância (ANOVA), apresentada na Tabela 6.

Tabela 6: Análise de variância para produtividade.

Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F calculado
Regressão	2171,33	2	1085,67	524,12
Resíduo	16,57	8	2,07	
Erro puro	1,90	2		
F ajuste	14,66	6		
Total	2187,90	10		

$$R = 0,99 ; F_{(0,95; 2,8)} = 4,46$$

Na Tabela 6 o coeficiente de correlação obtido para a produtividade foi de 0,99 e o F calculado foi em torno de 117,5 vezes maior que o valor tabelado, permitindo validar estatisticamente o modelo ($p < 0,05$).

A partir do modelo obtido foi possível obter a superfície de resposta para estabelecer as melhores condições para a obtenção da máxima produtividade. As superfícies de resposta e curvas de contorno estão apresentadas na Figura 9.

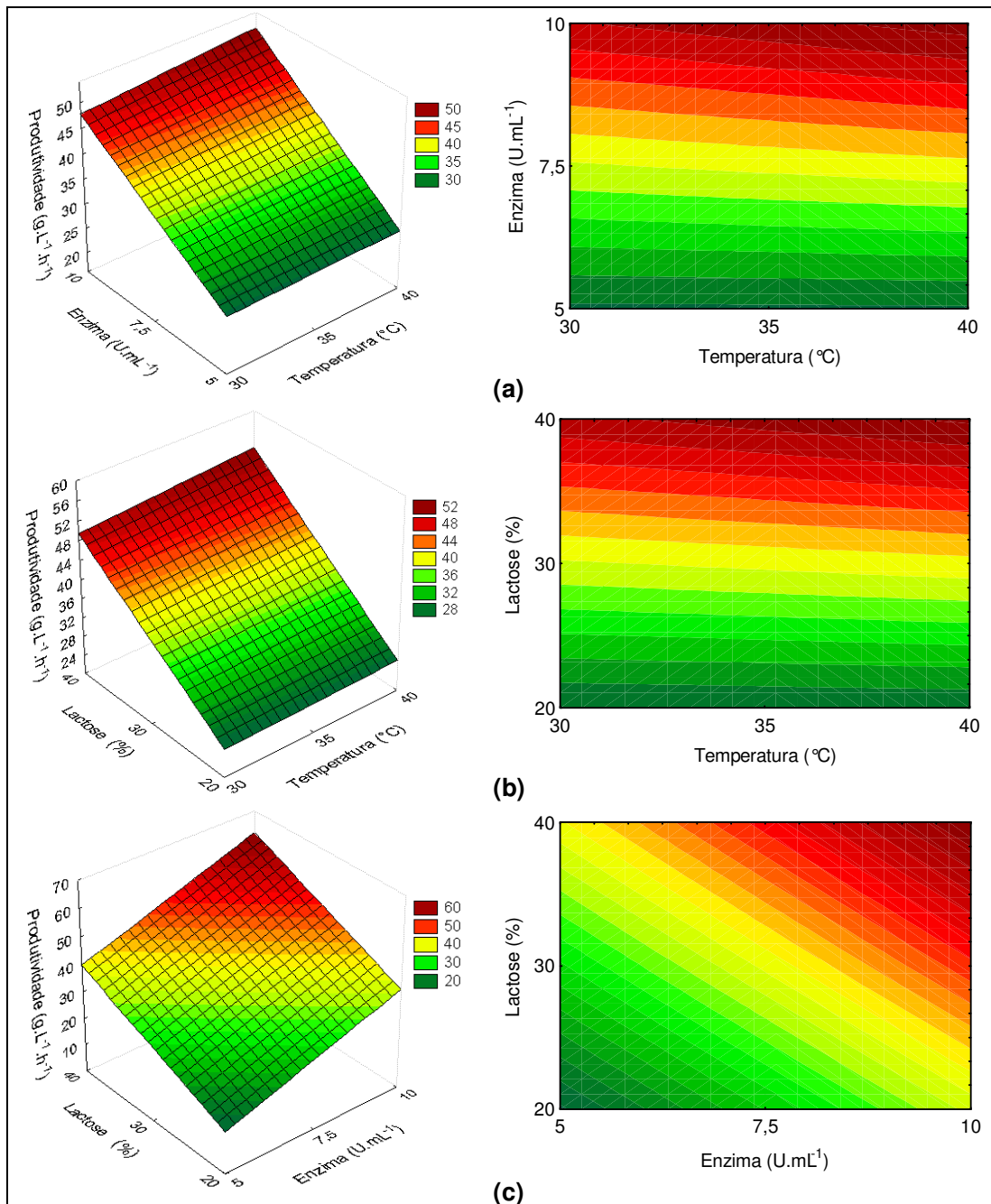


Figura 9: Superfícies de resposta e curvas de contorno para produtividade:

(a) Concentração de enzima x temperatura (concentração de lactose a 30%); (b) Concentração de lactose x temperatura (concentração de enzima a 7,5 U.mL⁻¹); e (c) Concentração de lactose x concentração de enzima (temperatura a 35°C).

A análise da Figura 9a mostra que o incremento da concentração de enzima proporcionou um aumento na produtividade, o que não foi observado para a variável temperatura, pois para toda a faixa estudada de temperatura a resposta

produtividade não se alterou, e o máximo valor de produtividade alcançado, aproximadamente $47 \text{ g.h}^{-1}.\text{L}^{-1}$, foi observado quando se empregou 10 U.mL^{-1} de enzima independente da temperatura.

Na Figura 9b, pode-se observar que o aumento da concentração de lactose gerou um aumento na produtividade. O máximo valor de produtividade alcançado, aproximadamente $50 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, foi observado quando se empregou 10 U.mL^{-1} de enzima.

Como podemos observar na Figura 9c, o incremento da concentração de lactose proporcionou um aumento mais significativo na resposta produtividade em altas concentrações de enzima. Comportamento similar também foi observado para a concentração de enzima. A resposta produtividade pode chegar a aproximadamente $67 \text{ g.h}^{-1}.\text{L}^{-1}$ quando o sistema reacional é composto por 40% de concentração de lactose e 10 U.mL^{-1} de concentração de enzima.

3.3.4. Conversão de lactose

A análise estatística dos resultados permitiu somente a obtenção dos efeitos das variáveis estudadas sobre as respostas, uma vez que não foi possível a obtenção de modelos estatisticamente significativos e preditivos.

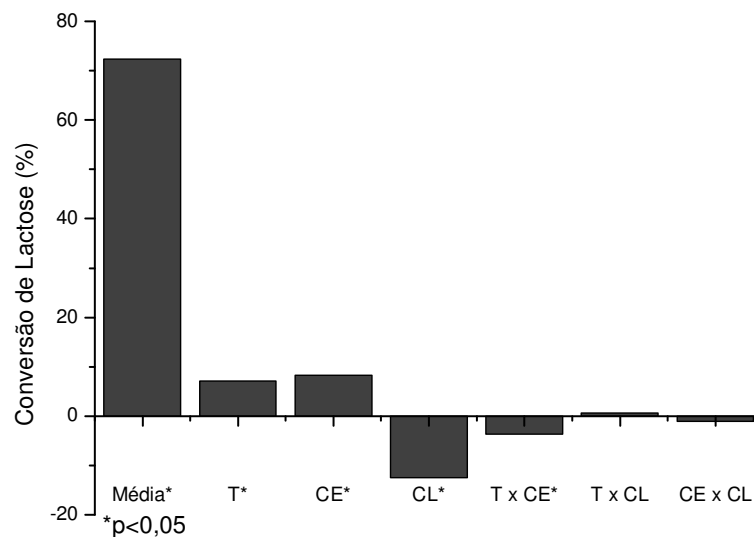


Figura 10: Efeitos principais e de interação das variáveis temperatura, concentração de enzima e concentração de lactose na conversão de lactose.

Pode-se observar na Figura 10 que todas as variáveis principais e a interação entre a concentração de enzima e temperatura tiveram efeito estatisticamente significativo sobre a resposta conversão de lactose. O incremento da temperatura e da concentração de enzima influenciaram positivamente a resposta, aumentando em média 7,2% e 8,3%, respectivamente. A concentração de lactose e a interação entre as variáveis concentração de enzima e temperatura apresentaram efeito contrário, influenciando a resposta de maneira negativa.

3.4. Efeito da Temperatura, Concentração de Enzima e Concentração de Lactose na Reação Enzimática

3.4.1. Efeito da temperatura

A temperatura apresentou efeito positivo sobre a concentração de GOS, rendimento e conversão de lactose, no entanto foi menos pronunciada que a concentração de lactose, em concordância com Boon e colaboradores (2000) para as enzimas de *Aspergillus oryzae* (Sigma), de *Kluyveromyces lactis* (Maxilact[®]) e *Kluyveromyces fragilis* (Lactozym[®]) na formação de galactooligossacarídeos a partir de lactose. Por outro lado, a produtividade não foi afetada pelo aumento da temperatura.

3.4.2. Efeito da concentração da enzima

O aumento da concentração de enzima favoreceu a reação enzimática, em termos de concentração de GOS, rendimento, produtividade e conversão de lactose. Geralmente, nas reações catalisadas por enzimas, a taxa de reação é diretamente proporcional à concentração da enzima, conforme observado por Rustom e colaboradores (1998) para as enzimas Maxilact[®] L2000 e Lactozym[®] 3000L.

3.4.3. Efeito da concentração de lactose

A concentração de lactose apresentou pronunciado efeito positivo sobre a concentração de GOS, rendimento e produtividade. A enzima β -galactosidase catalisa as reações de hidrólise e de transgalactosilação, que envolvem a transferência da unidade de galactose para um aceptor que contenha um grupo hidroxila. A lactose é hidrolisada a glicose e galactose quando a água atua como aceptor. Contudo, outros açúcares presentes na solução podem atuar como aceptores, levando à formação de GOS. Portanto, enfocando a transgalactosilação, a água pode ser considerada como um fator desfavorável para a síntese de GOS, quando uma grande quantidade de água está presente no sistema reacional. Em sistemas aquosos, esta desvantagem pode ser atenuada com o aumento da concentração de lactose (CHEN et al., 2001).

Diversos trabalhos apontam uma forte dependência entre a transgalactosilação e a concentração inicial de lactose. Foda & Lopez-Leiva (2000), com Maxilact[®] L2000, e Chen e colaboradores (2002), com β -galactosidase de *Aspergillus oryzae*, mostraram o mesmo comportamento observado neste trabalho. Já Rustom e colaboradores (1998) observaram a redução na formação de GOS com o aumento da concentração de lactose usando Maxilact[®] L2000, devido provavelmente ao aumento da concentração de inibidores oriundos do soro.

Por outro lado o aumento da concentração de lactose reduziu o grau de conversão de lactose, provavelmente associado a maior concentração de glicose e galactose formadas, que atuam como inibidores da reação.

4. CONCLUSÕES

Os resultados apresentados mostram a capacidade da enzima β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* Lactozym[®] 3000L (Novozymes) de hidrolisar a lactose presente no soro de leite e produzir galactooligossacarídeos pela reação de transgalactosilação.

As variáveis que mais influenciaram o processo, foram a concentração de lactose e a concentração de enzima, sendo que o efeito da temperatura foi menos pronunciado.

A técnica de planejamento experimental e análise de superfície de resposta foi utilizada para estabelecer as condições mais favoráveis para a síntese enzimática, visando a obtenção do sistema reacional mais favorável para produção de galactooligossacarídeos. Os valores máximos obtidos para as respostas concentração de GOS (119,8 g.L⁻¹), produtividade (64,4 g.L⁻¹.h⁻¹) e rendimento (29,9%) foram observados em 4 h no sistema reacional composto por 40% de lactose e 10 U.mL⁻¹ de enzima a 40 °C. Nesta condição, o grau de conversão de lactose foi de 68,7%, levando a obtenção de um produto contendo 35,9 g.L⁻¹ de galactose, 119,12 g.L⁻¹ de glicose, 122,1 g.L⁻¹ de lactose e 119,8 g.L⁻¹ de GOS.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKIYAMA, K.; TAKASE, M.; HORIKOSHI, K.; SHIGEO, O. Production of galactooligosaccharides from lactose using a β -glucosidase from *Thermus sp.* Z-1. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 65, n. 2, p. 438–441, 2001.

- AOAC – ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Official Methods of Analysis. 16 th edition. Virginia, USA, 1995.
- BELEN, M. A. F.; LEE, B. H. Production of bioingredients from *Kluyveromyces marxianus* grown on whey: an alternative. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 38, n. 7, p. 565-598, 1998.
- 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.
- CHEN, C. S.; HSU, C. K.; CHIANG, B. H. Optimization of the enzymic process for manufacturing low-lactose milk containing oligosaccharides. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 801-808, 2002.
- CHEN, S. X.; WEI, D. Z.; HU, Z. H. Synthesis of galacto-oligosaccharides in AOT/isooctane reverse micelles by β -galactosidase. **Journal of Molecular Catalisys B: Enzymatic**, v. 16, p. 109-114, 2001.
- CODEX ALIMENTARIUS. **Standard for whey powder**. Codex Stan A - 15 - 1995, (2006).
- CRITTENDEN, 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.
- DEL-VAL, M. I.; OTERO, C. Biphasic aqueous media containing polyethylene glycol for the enzymatic synthesis of oligosaccharides from lactose. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 33, p. 118-126, 2003.
- FODA, M. I.; LÓPEZ-LEIVA, M. Continuous production of oligosaccharides from whey using a membrane reactor. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 581-587, 2000.
- GHALY, A. E.; KAMAL, M.; CORREIA, L. R. Kinetic modeling of continuous submerged fermentation of cheese whey for single cell protein production. **Bioresource Technology**. v. 96, p. 1143-1152, 2004.
- 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.
- INCHAURRONDO, 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**, v. 29, p. 47-54, 1994.

OHTSUOKA, K.; BENNO, Y.; ENDO, K.; UEDA, H.; OZAWA, O.; UCHIDA, T.; MITSUAKA, T. Effects of 4'galactosyl-lactose intake on human fecal flora. **Bifidus**, v. 2, p. 143-149, 1989.

ONISHI, N.; TANAKA, T. Purification and properties of novel thermostable galacto-oligosaccharides producing β -galactosidase from *Sirobasidium eliviae*. **Applied and Enviromental Microbiology**, v. 61, p. 4026-4030, 1995.

RODRIGUES, I. M.; IEMMA, A. F. **Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos**. Campinas – SP. Editora Casa do Pão, 2005, 325 p.

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

CAPÍTULO IV
CONCLUSÕES GERAIS E SUGESTÕES

1. CONCLUSÕES GERAIS

Os resultados apresentados mostram a capacidade da enzima β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* Lactozym® 3000L (Novozymes) de converter tanto a lactose pura quanto a lactose presente no soro de leite e produzir galactooligossacarídeos (GOS) pela reação de transgalactosilação, em condições reacionais distintas conforme o substrato utilizado.

Para a reação enzimática utilizando como substrato lactose, o planejamento experimental mostrou que a redução da temperatura de 40 °C para 30 °C, o aumento da concentração de enzima de 5 U.mL⁻¹ para 10 U.mL⁻¹ e o aumento de concentração de lactose de 20% para 40% favoreceram a reação de transgalactosilação. O maior rendimento (43,8%) e a maior concentração de GOS (175,3 g.L⁻¹) foram obtidos quando o sistema foi composto por 40% de lactose, 10 U.mL⁻¹ de enzima a 30 °C após 16 h de reação. Nesta condição, foi obtido um produto contendo 27,7% de glicose e 28,5% de lactose, correspondendo a uma conversão de lactose de 71,5%. Por outro lado a conversão máxima de lactose (80,5%) foi atingida a uma menor concentração inicial de substrato (20%).

A técnica de planejamento experimental e análise de superfície de resposta foi utilizada a fim de estabelecer o sistema reacional mais favorável para produção de GOS a partir de soro de leite. Os valores máximos obtidos para as respostas concentração de GOS (119,8 g.L⁻¹), produtividade (64,4 g.L⁻¹.h⁻¹) e rendimento (29,9%) foram observados em 4 h no sistema reacional composto por 40% de lactose e 10 U.mL⁻¹ de enzima a 40 °C. Nesta condição, o grau de conversão de lactose foi de 68,7%, levando a obtenção de um produto contendo 35,9 g.L⁻¹ de galactose, 119,1 g.L⁻¹ de glicose e 125,1 g.L⁻¹ de lactose. A conversão máxima de lactose obtida para o soro de leite foi de 87,8%, mas com 20% de lactose.

Desta forma, pode-se afirmar que a enzima Lactozym® 3000L (Novozymes) apresenta desempenho distinto na reação de transgalactosilação com os diferentes substratos, possivelmente devido à presença de inibidores da enzima β -galactosidase no soro de leite. Concentrações mais elevadas de lactose claramente favorecem o mecanismo de transgalactosilação, enquanto que em concentrações menores predomina o mecanismo hidrolítico. Também é importante destacar que o máximo rendimento em GOS não está associado à máxima conversão de lactose e que o estabelecimento do tempo de reação para transgalactosilação é essencial devido à hidrólise dos GOS.

2. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Estudar a reação de transgalactosilação em sistemas não-aquosos.

Estudar a reação de transgalactosilação com a enzima imobilizada.

CAPÍTULO V
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKIYAMA, K.; TAKASE, M.; HORIKOSHI, K.; SHIGEO, O. Production of galactooligosaccharides from lactose using a β -glucosidase from *Thermus sp.* Z-1. **Bioscience, Biotechnology & Biochemistry**, v. 65, n. 2, p. 438–441, 2001.
- 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 and persistence of *Bifidobacterium lactis* Bb12 in the gastrointestinal tract. **International Dairy Journal**, v. 11, p. 817- 825, 2001.
- ALMEIDA, M. M. **Síntese de galactooligosacarídeos por β -galactosidase de *Scopulariopsis sp* a partir da lactose**. Campinas – SP, 2003. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas.
- ALMEIDA, M. M.; PASTORE, G. M. Galactooligosacarídeos – Produção e efeitos benéficos. **Boletim da SBCTA**, v. 35, p. 12-19, 2001.
- ANDRADE, R. L. P.; MARTINS J. F. P. Influência da adição da fécula de batata-doce sobre a viscosidade do permeado de soro de queijo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 22, n. 3, 2002.
- AOAC – ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis**. 16 th edition. Virginia, USA, 1995.
- BECERRA, M.; GONSÁLEZ SISO, M. I. Yeast β -galactosidase in solid-state fermentations. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 19, p. 39-44, 1996.
- BELEN, M. A. F.; LEE, B. H. Production of bioingredients from *Kluyveromyces marxianus* grown on whey: an alternative. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 38, n. 7, p. 565-598, 1998.
- BERGER, J. L.; LEE, B. H.; LACROIX, C. Purification, properties and characterization of a high-molecular-mass β -galactosidase isoenzyme from *Thermus aquaticus*. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 25, p. 29-41, 1997.
- BOBBIO, P. A., BOBBIO, F. O. **Introdução a Química de Alimentos**. São Paulo – SP. Livraria Varela, 1992.
- 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.

- CHEN, S. X.; WEI, D. Z.; HU, Z. H. Synthesis of galacto-oligosaccharides in AOT/isooctane reverse micelles by β -galactosidase. **Journal of Molecular Catalisys B: Enzymatic**, v. 16, p. 109-114, 2001.
- CHEN, C. S.; HSU, C. K.; CHIANG, B. H. Optimization of the enzymic process for manufacturing low-lactose milk containing oligosaccharides. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 801-808, 2002.
- CHEN, C. W.; YANG, C. C. O.; YEH, C. W. Synthesis of galactooligosaccharides and transgalactosylation modeling in reverse micelles. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 33, p. 497-507, 2003.
- CHOCKCHASAWASDEE, 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.
- CODEX ALIMENTARIUS. **Standard for whey powder**. Codex Stan A - 15 - 1995, 2006.
- CRITTENDEN, 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.
- CRUZ, R.; CRUZ, V.D.; BELOTE, J.G.; KHENAYFES, M.O.; DORTA, C.; OLIVEIRA, L.H.S.; ARDILES, E.; GALLI, A. Production of transgalactosylated oligosaccharides (TOS) by galactosyltransferase activity from *Penicillium simplicissimum*. **Bioresource Technology**, v. 70, p. 165-171, 1999.
- 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.
- DEL-VAL, M. I.; OTERO, C. Biphasic aqueous media containing polyethylene glycol for the enzymatic synthesis of oligosaccharides from lactose. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 33, p. 118-126, 2003.
- FODA, M. I.; LÓPEZ-LEIVA, M. Continuous production of oligosaccharides from whey using a membrane reactor. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 581-587, 2000.

- GHALY, A. E.; KAMAL, M.; CORREIA, L. R. Kinetic modeling of continuous submerged fermentation of cheese whey for single cell protein production. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 1143-1152, 2004.
- GOPAL, P. K.; SULLIVAN, P. A.; SMART, J. B. Utilization of galacto-oligosaccharides as selective substrates for grow by lactic acid bacteria including *Bifidobacterium lactis* DR10 and *Lactobacillus rhamnosus* DR20. **International Dairy Journal**, v. 11, p. 19-25, 2001.
- 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.
- HUH, K. T.; TOBA, T.; AACHI, S. Oligosaccharide formation during the hydrolysis of lactose with hydrochloric acid and cation exchange resin. **Food Chemistry**, v. 38, p. 305-314, 1990.
- HUNG M. N.; LEE, B. H. Purification and characterization of a recombinant with transgalactosylation activity from *Bifidobacterium infantis* HL96. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 58, p. 439-45, 2002.
- 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.
- INCHAURRONDO, 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**, v. 29, p. 47-54, 1994.
- KUNZ, C.; RUDOLF, S.; HINTELMANN, A.; POHLENTZ, G.; EGGE, H. High-pH anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection and molar response factors of human milk oligosaccharides. **Journal of Chromatography B: Biomedical Applications**, v. 685, p. 211-221, 1996.
- LEE, Y. C. Carbohydrate analyses with high-performance anion-exchange chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 750, p. 137-149, 1996.
- LÓPEZ LEIVA, M. H.; GUZMAN, M. Formation of oligosaccharides during enzymic hydrolysis of milk whey permeates. **Process Biochemistry**, v. 30, p. 757-762, 1995.
- MAHONEY, R. R. Galactosyl-oligosaccharide formation during lactose hydrolysis: a review. **Food Chemistry**, v. 63, p. 147-154, 1998.

- MARTENS, D. A.; FRANKENBERGER, W. T. Determination of saccharides by high performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection. **Chromatographia**, v. 29, n. 1/2, January, 1990.
- MATSUMOTO, K.; KOBAYASHI, Y.; UEYAMA, S.; WATANABE, T.; TANAKA, R. KAN, T.; KUROBA, A.; SUMIHARA, Y. Oligosaccharides: production, properties and applications. **Gordon and Breach Science**, p. 90-106, 1990.
- MESOMO, M. C. **Produção de goma xantana em biorreator utilizando meio a base de soro de queijo**. Erechim – RS, 2007. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Regional do Alto Uruguai e das Missões – URI – Campus de Erechim.
- MITSUOKA, T. Bifidobacteria and their role in human health. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 6, p. 263-268, 1990.
- MODLER, H. W.; MCKELLAR, R. C.; YAGUCHI, M. Bifidobacteria and bifidogenic factors. **Canadian Institute of Food Science and Technology**, v. 23, p. 29-41, 1990.
- 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. 1333–1341, 2002.
- 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.
- OHTSUOKA, K.; BENNO, Y.; ENDO, K.; UEDA, H.; OZAWA, O.; UCHIDA, T.; MITSUOKA, T. Effects of 4'galactosyl-lactose intake on human fecal flora. **Bifidus**, v. 2, p. 143-149, 1989.
- ONISHI, N.; TANAKA, T. Purification and properties of novel thermostable galactooligosaccharides producing β -galactosidase from *Sirobasidium eliviae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, p. 4026-4030, 1995.
- ONISHI, N.; TANAKA, T. Purification and characterization of galactooligosaccharides producing β -galactosidase from *Sirobasidium magnum*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 24, p. 82-86, 1997.

- PERRIN, V.; FENET, B.; PRALY, J. P.; LECROIX, F.; TA, C.D. Identification and synthesis of a trisaccharide produced from lactose by transgalactosylation. **Carbohydrate Research**, v. 325, p. 202-210, 2000.
- REUTER, S.; NYGAARD, A. R.; ZIMMERMANN, W. β -Galactooligosaccharide synthesis with β -galactosidase from *Sulfolobus solfataricus*, *Aspergillus oryzae* and *Escherichia coli*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 25, p. 509-516, 1999.
- RICHMOND, M.L.; STINE, C.M. β -galactosidase: review of recent research related to technological applications, nutritional concerns, and immobilization. **Journal of Dairy Science**, v. 64, n. 9, p. 1579-1771, 1981.
- RODRIGUES, I. M.; IEMMA, A. F. **Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos**. Campinas – SP: Editora Casa do Pão, 2005. 325p.
- ROY, D.; DAOUDI, L.; AZAOLA, A. Optimization of galacto-oligosaccharide production by *Bifidobacterium infantis* RW-8120 using response surface methodology. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 29, p. 281-285, 2002.
- RUSTOM, I. Y. S.; FODA, M. I.; LOPEZ-LEIVA, M. H. Formation of oligosaccharides from whey UF-permeate by enzymatic hydrolysis – analysis of factors. **Food Chemistry**, v. 62, p. 141- 147, 1998.
- 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.
- 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 e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 4, p. 567–572, 2004.
- SANTOS, A. M. P. **Síntese de oligossacarídeo a partir de sacarose por inulinase de *kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus***. Campinas – SP, 2002. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, 161p.
- SANTOS, R. **Produção de galactooligossacarídeo por lactase fúngica**. Campinas – SP, 2006. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, 54p.

- SCHIWECK, H.; MOHAMMED, M.; RAPP, K. M. New developments in the use sucrose as industrial bulk chemical. In: **Carbohydrates as Organic Raw Materials**. New York: Ed. Lichtenthaler, p. 57-94, 1995.
- SHAIKH, S. A.; KHIRE, J. M.; KHAN, M.I. Characterization of a thermostable extracellular β -galactosidase from a thermophilic fungus *Rhizomucor* sp. **Biochemical and Biophysica Acta**, v. 1472, n.1-2, p. 314-22, 1999.
- SHIN, H. J.; PARK, J. M.; YANG, J. W. Continuous production of galacto-oligosaccharides from lactose by *Bullera singularis* β -galactosidase immobilized in chitosan beads. **Process Biochemistry**, v. 33, p. 787-792, 1998.
- SMART, J. Transferase reactions of the β -galactosidase from *Streptococcus thermophilus*, **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 34, p. 495-501, 1990.
- 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.
- TOMOMATSU, H. Health effects of oligosaccharides. **Food Technology**, v. 48, p. 61-65, 1994.
- ZHOU, Q. Z. K.; CHEN, X. D. Effects of temperature and pH on the activity of immobilized β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 9, p. 33-40, 2001.
- WEISS, J. Ion Chromatography, VHC Publishers, Inc., New York, NY (USA), second edition, 1995.