



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS



## **PRODUÇÃO DE GALACTOOLIGOSSACARÍDEOS POR LINHAGENS FÚNGICAS**

***Daniele Rodrigues***

Bióloga

***Profa. Dra. Gláucia Maria Pastore***

Orientadora

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos, da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos.

Campinas-SP

2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

R618p      Rodrigues, Daniele  
              Produção de galactooligossacarídeos por linhagens fúngicas /  
              Daniele Rodrigues -- Campinas, SP: [128p.], 2009.

              Orientador: Gláucia Maria Pastore  
              Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas.  
              Faculdade de Engenharia de Alimentos

              1. Seleção. 2. Alimentos funcionais. 3. Prebióticos. 4.  
              Galactooligossacarídeos. 5.  $\beta$ -galactosidase. I. Pastore, Gláucia  
              Maria. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de  
              Engenharia de Alimentos. III. Título.

Título em inglês: Production of galactooligosaccharides by fungi strains

Palavras-chave em inglês (Keywords): Screening, Functional food, Prebiotics,  
Galactooligosaccharides,  $\beta$ -galactosidase

Titulação: Mestre em Ciência de Alimentos

Banca examinadora: Gláucia Maria Pastore

Gabriela Alves Macedo

Tomomasa Yano

Programa de Pós Graduação: Programa em Ciência de Alimentos

## **BANCA EXAMINADORA**

---

Profa. Dra. Gláucia Maria Pastore  
Faculdade de Engenharia de Alimentos - UNICAMP  
Orientadora

---

Profa. Dra. Gabriela Alves Macedo  
Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP  
Membro

---

Prof. Dr. Tomomasa Yano  
Faculdade de Biologia – UNICAMP  
Membro

---

Prof. Dr. Yong Kun Park  
Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP  
Suplente

---

Dra. Yara Maria Franco Moreno  
Nutricionista  
Suplente



"Consulte não a seus medos, mas a suas esperanças e sonhos.  
Pense não sobre suas frustrações, mas sobre seu potencial não usado.  
Preocupa-se não com o que você tentou e falhou, mas com aquilo que ainda é  
possível a você fazer".

Papa João XXIII



Dedico este trabalho  
aos meus grandes amores,  
meus pais Nelson e Clélia,  
pelo imenso amor, companheirismo,  
oportunidade e credibilidade ao longo  
de minha formação acadêmica.





## **AGRADECIMENTOS**

À Faculdade de Engenharia de Alimentos,  
Em especial ao Departamento de Ciência de Alimentos, por possibilitar a realização desse trabalho.

A Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Gláucia Maria Pastore,  
Orientadora e incentivadora deste trabalho, pela acolhida em seu laboratório, dedicação, apoio e amizade, minha sincera gratidão.

Ao CNPq,  
Pelo auxílio financeiro para a realização desta pesquisa.

Ao Apiário Baldoni,  
Por ceder gentilmente as amostras de favo de mel utilizadas no trabalho.

A banca examinadora,  
Pelas valiosas correções e contribuições.

Aos amigos de laboratório Angélica, Rosângela, Dani gaúcha, Cecília, Luciana, Juliano, Júnio, Mariana, Fábio, Cd, Xispita, Gustavo, Juliana, Dora, Nadir e às iniciações científicas,  
Pelas horas de descontração, ajuda, amizade e que, de alguma maneira, contribuíram para a realização deste trabalho.

À Rosângela dos Santos,  
Por compartilhar seus conhecimentos e ter me ajudado na realização dos experimentos, pela amizade, companheirismo e paciência.

À Ana Paula Dionísio,

Que me ajudou na realização parcial deste trabalho, pela amizade e confiança.

As minhas amigas de república mais legais do mundo Dani, Pati e Rê,

Por compartilhar comigo meus problemas, minhas alegrias, minhas dúvidas, pela amizade, ajuda, compreensão, paciência, pelos momentos divertidíssimos, pelas bebedeiras, afinal ninguém é de ferro, e por tornar minha vida em Campinas mais divertida.

A todos os meus amigos e amigas,

Pelo apoio, compreensão, incentivo e palavras de carinho que não me deixaram cair no decorrer destes anos.

Ao meu namorado Rodrigo,

Por estar sempre presente e tornar minha vida mais completa, pelo grande amor, companheirismo, carinho, palavras de incentivo e por me fazer cada dia mais feliz.

À minha família Márcia, Dê, Rodrigo, Pedro, Anna e Gabi,

Pelo amor, carinho, apoio e incentivo durante todos esses anos, sem eles eu não teria conseguido.

A Deus,

Por me conduzir em caminhos abençoados.

Daniele Rodrigues

## ÍNDICE GERAL

<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>xv</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>xix</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>xxi</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>xxv</b>
<b>INTRODUÇÃO GERAL.....</b>	<b>01</b>
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>03</b>

### **CAPÍTULO 1:**

<b>GALACTOOLIGOSSACARÍDEOS: EFEITOS BENÉFICOS E PRODUÇÃO....</b>	<b>05</b>
Resumo.....	07
Abstract.....	07
1. Introdução.....	08
2. Revisão Bibliográfica.....	09
2.1. Alimentos funcionais e prebióticos.....	09
2.2. Oligossacarídeos.....	17
2.3. Propriedades físico-químicas e funcionais dos oligossacarídeos.....	20
2.3.1. Efeito bifidogênico e melhora do hábito intestinal.....	22
2.3.2. Sistema imunológico e doenças inflamatórias intestinais.....	23
2.3.3. Inibição do câncer de cólon.....	24
2.3.4. Estímulo da biodisponibilidade de determinados minerais.....	25
2.3.5. Influência sobre o metabolismo lipídico.....	26
2.4. Propriedades da enzima $\beta$ -galactosidase e produção biotecnológica de galactooligossacarídeos.....	27
3. Referências Bibliográficas.....	34

### **CAPÍTULO 2:**

<b>SELEÇÃO DE FUNGOS PRODUTORES DA ENZIMA <math>\beta</math>-GALACTOSIDASE PARA PRODUÇÃO DE GALACTOOLIGOSSACARÍDEOS.....</b>	<b>43</b>
--	-----------

Resumo.....	45
Abstract.....	45
1. Introdução.....	46
2. Material e Métodos.....	47
2.1. Coleta do material e isolamento dos microrganismos.....	47
2.2. Produção do extrato enzimático bruto liofilizado.....	48
2.2.1. Preparação do inoculo.....	48
2.2.2. Fermentação.....	48
2.2.3. Extração enzimática.....	48
2.3. Primeira seleção: Determinação da atividade de $\beta$ -galactosidase .....	49
2.4. Segunda seleção: Determinação da produção de galactooligossacarídeos.....	49
2.4.1. Produção de galactooligossacarídeos.....	49
2.4.2. Análise dos galactooligossacarídeos.....	50
3. Resultados e Discussão.....	50
3.1. Seleção dos microrganismos.....	50
3.2. Primeira seleção: Determinação da atividade enzimática.....	51
3.3. Segunda seleção: Determinação da produção de galactooligossacarídeos.....	52
4. Conclusões.....	57
5. Referências Bibliográficas.....	58

### **CAPÍTULO 3:**

#### **ESTUDO DO PROCESSO FERMENTATIVO PARA PRODUÇÃO DO**

#### **EXTRATO BRUTO DA ENZIMA $\beta$ -GALACTOSIDASE.....**

Resumo.....	63
Abstract.....	64
1. Introdução.....	64
2. Material e Métodos.....	66

2.1. Microrganismos e produção do inóculo.....	66
2.2. Fermentação.....	66
2.3. Extração enzimática.....	67
2.4. Determinação da atividade de $\beta$ -galactosidase .....	68
3. Resultados e Discussão.....	68
4. Conclusões.....	71
5. Referências Bibliográficas.....	72

#### **CAPÍTULO 4:**

#### **CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO BRUTO DA ENZIMA $\beta$ - GALACTOSIDASE PARA PRODUÇÃO DE**

<b>GALACTOOLIGOSSACARÍDEOS.....</b>	<b>75</b>
Resumo.....	77
Abstract.....	78
1. Introdução.....	78
2. Material e Métodos.....	80
2.1. Microrganismo produtor da enzima $\beta$ -galactosidase.....	80
2.2. Produção do extrato enzimático bruto liofilizado.....	80
2.2.1. Preparação do inóculo.....	80
2.2.2. Fermentação.....	80
2.2.3. Extração enzimática.....	80
2.3. Determinação da atividade de $\beta$ -galactosidase .....	81
2.4. Caracterização da enzima $\beta$ -Galactosidase para produção de galactooligossacarídeos .....	81
2.4.1. Efeito da temperatura na produção de galactooligossacarídeos.....	82
2.4.2. Efeito do pH na produção de galactooligossacarídeos.....	82
2.4.3. Efeito da concentração do extrato enzimático bruto liofilizado na produção de galactooligossacarídeos.....	83

2.4.4. Efeito da concentração inicial de lactose na produção de galactooligossacarídeos.....	83
2.4.5. Cinética para produção de galactooligossacarídeos.....	83
3. Resultados e Discussão.....	84
3.1. Caracterização da enzima $\beta$ -Galactosidase para produção de galactooligossacarídeos .....	84
3.1.1. Efeito da temperatura na produção de galactooligossacarídeos.....	84
3.1.2. Efeito do pH na produção de galactooligossacarídeos.....	86
3.1.3. Efeito da concentração do extrato enzimático bruto liofilizado na produção de galactooligossacarídeos.....	87
3.1.4. Efeito da concentração inicial de lactose na produção de galactooligossacarídeos.....	89
3.1.5. Cinética para produção de galactooligossacarídeos.....	90
4. Conclusões.....	92
5. Referências Bibliográficas.....	93
<b>CONCLUSÕES GERAIS.....</b>	<b>97</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>98</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 - Comportamento dos prebióticos no trato gastrointestinal humano.....	13
Figura 1.2 - Parâmetros estabelecidos pela FAO (Food and Agricultural Organization) para classificar um alimento como prebiótico ....	14
Figura 1.3 - Reações dos ingredientes alimentares probióticos e prebióticos com a microbiota intestinal, relativo a seus efeitos sobre a saúde.....	15
Figura 1.4 - Número de artigos na base de dados MEDLINE no período de 1996 a 2005, com a presença das palavras probióticos e prebióticos.....	16
Figura 1.5 - Demanda de oligossacarídeos no Japão (toneladas/ano). ( ) preço médio, em yens, por quilograma de cada produto.....	18
Figura 1.6 - Prebióticos como fatores bifidogênicos.....	22
Figura 1.7 - Esquema de diagrama mostrando a produção de galactooligossacarídeos a partir de lactose.....	28
Figura 2.1 - Cromatograma obtido pela linhagem <i>Aspergillus sp</i> (LB-32). Legenda: 1 – pico referente à 4'galactosil-lactose; 2 – pico referente à lactose; 3 – pico referente à glicose; 4 – pico referente à galactose.....	52
Figura 2.2 - Cromatograma obtido pela linhagem <i>Penicillium sp</i> (LB-51). Legenda: 1 – pico referente à 4'galactosil-lactose; 2 – pico referente à lactose; 3 – pico referente à glicose; 4 – pico referente à galactose.....	53
Figura 2.3 - Cromatograma obtido pela linhagem <i>Scopulariopsis sp</i> (LB-35). Legenda: 1 – pico referente à 4'galactosil-lactose; 2 – pico referente à lactose; 3 – pico referente à glicose; 4 – pico referente à galactose.....	53

Figura 2.4 - Cromatograma obtido pela linhagem <i>Aspergillus sp</i> (LB-01). Legenda: 1 – pico referente à 4'galactosil-lactose; 2 – pico referente à lactose; 3 – pico referente à glicose; 4 – pico referente à galactose.....	54
Figura 2.5 - Cromatograma obtido pela linhagem <i>Aspergillus sp</i> (LB-36). Legenda: 1 – pico referente à 4'galactosil-lactose; 2 – pico referente à lactose; 3 – pico referente à glicose; 4 – pico referente à galactose.....	54
Figura 2.6 - Fotografia ilustrando as características específicas do gênero <i>Aspergillus sp</i> obtida através de microscópio óptico comum.....	56
Figura 2.7 - Fotografia ilustrando as características específicas do gênero <i>Penicillium sp</i> obtida através de microscópio óptico comum.....	56
Figura 2.8 - Fotografia ilustrando as características específicas do gênero <i>Scopulariopsis sp</i> obtida através de microscópio óptico comum.....	57
Figura 4.1 - Efeito da temperatura e do tempo de reação na síntese de 4'galactosil-lactose.....	85
Figura 4.2 - Efeito do pH e do tempo de reação na síntese de 4'galactosil- lactose.....	87
Figura 4.3 - Efeito da concentração do extrato enzimático bruto liofilizado e do tempo de reação na síntese de 4'galactosil- lactose.....	88
Figura 4.4 - Efeito da concentração inicial da lactose e do tempo de reação na síntese de 4'galactosil-lactose.....	89
Figura 4.5 - Curva de produção de 4'galactosil-lactose em relação ao tempo de reação.....	90



Figura 4.6 - Curva de produção de 4'galactosil-lactose, glicose e 91 galactose através da reação de transgalactosilação da lactose catalisada pela enzima  $\beta$ -galactosidase.....



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 - Estudos utilizando diferentes microrganismos para a produção de galactooligossacarídeos (GOS) a partir da lactose.....	31
Tabela 2.1 - Microrganismos com maiores valores de atividade enzimática	52
Tabela 3.1 - Tratamentos utilizados para o estudo da fermentação.....	67
Tabela 3.2 - Valores médios das atividades enzimáticas (em Unidades) obtidas para cada microrganismo utilizado no estudo da fermentação.....	69



## RESUMO

Atualmente, um dos desenvolvimentos mais significativos na ciência é o de alimentos funcionais, relacionado ao desenvolvimento de suplementos dietéticos que afetam benéficamente a saúde. Dentre esses pode-se citar os galactooligossacarídeos, que é um grupo de oligossacarídeos considerados como carboidratos não digeríveis devido sua resistência à hidrólise das enzimas do intestino. Dentre os benefícios obtidos com a ingestão de galactooligossacarídeos estão o aumento da população de bifidobactérias no cólon e, com isso, a redução dos níveis de bactérias patogênicas, além do aumento da absorção de cálcio, estimulação do sistema imune, combate a infecções intestinais, regulação do colesterol sérico e a redução do risco de câncer de cólon. A produção dos galactooligossacarídeos tem sido estudada extensivamente em microrganismos, através da reação de transgalactosilação enzimática catalisada pela  $\beta$ -galactosidase. O principal objetivo do presente trabalho foi a produção da enzima  $\beta$ -galactosidase por linhagens fúngicas para produção de galactooligossacarídeos. Primeiramente os fungos foram selecionados aleatoriamente da coleção de microrganismos do Laboratório de Bioaromas (Departamento de Ciência de Alimentos – UNICAMP) e isolados de amostras de favo de mel coletadas na cidade de Itapira-SP. Posteriormente, os microrganismos foram testados quanto à produção da enzima  $\beta$ -galactosidase e atividade de transgalactosilação. Para o estudo do processo fermentativo, foram selecionados 3 microrganismos com maior atividade de transgalactosilação. Foi realizado um delineamento experimental, composto por 9 tratamentos, visando avaliar o efeito da temperatura (24, 30 e 36 °C), umidade (40, 50 e 60%) e concentração de lactose (0, 7,5 e 15%) no meio para a produção enzimática. Em seguida, foi selecionado o melhor microrganismo para extração e caracterização da enzima para a produção de galactooligossacarídeos. As variáveis estudadas foram: temperatura (35, 45, 55 e 65 °C), pH (4, 5, 6 e 7), concentração de lactose inicial (20, 30, 40 e 50%) e concentração do extrato enzimático bruto liofilizado (52, 104, 156 e 208 U). De

todos os ensaios, foram retiradas alíquotas depois de 6, 12, 24, 36, 48 e 72 horas de reação. Para avaliar a influência do tempo na síntese de galactooligossacarídeo, foi realizada uma curva cinética para medir a produção em 3, 6, 9, 12, 18, 24, 30, 36, 48 e 72 horas de reação. A seleção de microrganismos resultou em 5 linhagens produtoras de galactooligossacarídeos: *Aspergillus sp* (LB-01), *Aspergillus sp* (LB-32), *Aspergillus sp* (LB-36), *Penicillium sp* (LB-51) e *Scopulariopsis sp* (LB-35). O microrganismo com maior produção de 4'galactosil-lactose foi o *Aspergillus sp* (LB-32) que converteu 19,17% da lactose presente no meio e produziu 7,25% do tetrassacarídeo. O segundo maior produtor foi *Penicillium sp* (LB-51) com produção de 6,71%, seguido por *Scopulariopsis sp* (LB-35) com 6,65%, *Aspergillus sp* (LB-01) com 5,22% e *Aspergillus sp* (LB-36) com 4,97% de produção de galactooligossacarídeo. O estudo do processo fermentativo foi realizado com os seguintes microrganismos: *Aspergillus sp* (LB-32), *Penicillium sp* (LB-51) e *Scopulariopsis sp* (LB-35). Pôde-se observar que alguns tratamentos favoreceram o crescimento dos microrganismos, enquanto outros foram desfavoráveis. O tratamento controle T9 (que compreende as condições 30 °C, 0% de concentração de lactose no meio e 50% de umidade) foi o que mais se destacou, apresentando os maiores valores de atividade para todos os microrganismos. Todos os outros tratamentos possuíam valores de atividade enzimática significativamente inferiores ( $P < 0,05$ ) aos valores obtidos no tratamento controle. Os resultados da caracterização enzimática mostraram que, para o microrganismo *Aspergillus sp* (LB-32), as temperaturas mais altas (65 °C) e os valores de pH mais baixos (pH 4) foram favoráveis para a produção de 4'galactosil-lactose. A concentração inicial de 50% de lactose foi desfavorável devido à precipitação da mesma, estando a maior produção de galactooligossacarídeo no valor referente a 40% de lactose. O aumento na concentração enzimática foi diretamente proporcional ao aumento da produção de 4'galactosil-lactose, sendo o melhor resultado com a utilização de 208 U. Todos os ensaios mostraram melhores resultados quando a reação atingiu 48 horas. Através da curva cinética, notou-se que a produção de galactooligossacarídeo

inicia-se depois de 3 horas de reação, atingindo o máximo de produção em 48 horas. O melhor resultado foi obtido com o uso da temperatura em 65 °C, produzindo 12,10% de 4'galactosil-lactose, através da conversão de 31,27% da lactose.

Termos de indexação: Seleção, alimentos funcionais, prebióticos, oligossacarídeos, galactooligossacarídeos,  $\beta$ -galactosidase, *Aspergillus sp*, *Penicillium sp*, *Scopulariopsis sp*.





## ABSTRACT

Actually, one of the most significant development in science are functional foods, connected with the development of dietetic supplement that affects beneficially the health. Among these, we can mention the galactooligosaccharides, that is a group of oligosaccharides considered as non-digestible carbohydrates due to their resistance to hydrolysis of intestine enzymes. Among the benefits obtained with galactooligosaccharides ingestion are the increase of bifidobacteria population in the colon and, by their antagonistic effect, the reduction of the pathogenic bacteria level, over the increase of calcium absorption, immune system stimulation, intestinal diseases combat, serum cholesterol regulation and the reduction of colon's cancer risks. The production of galactooligosaccharides has been extensively studied in microorganisms, through the transgalactosylation reaction catalyzed by  $\beta$ -galactosidase enzyme. The aim of this work was the production of  $\beta$ -galactosidase enzyme by fungus strains to produce galactooligosaccharide. Firstly, the fungus were randomly removed from the microorganisms collection of Bioaromas Laboratory (Food Science Department – UNICAMP) and isolated from honeycomb collected at Itapira-SP. After this, the microorganisms were tested for the production of the  $\beta$ -galactosidase enzyme and transgalactosylation activity. To study the fermentative process, it was selected 3 microorganisms with the largest transgalactosylation activity. An experimental design was realized, consisting of 9 treatments, to evaluate the effect of temperature (24, 30 and 36 °C), humidity (40, 50 and 60%) and lactose concentration (0, 7,5 and 15%) in medium to produce the enzyme. After, it was selected the best microorganism to characterize its enzyme to produce galactooligosaccharides. The studied variables were: temperature (35, 45, 55 and 65 °C), pH (4, 5, 6 and 7), initial lactose concentration (20, 30, 40 and 50%) and lyophilized brute extract concentration (52, 104, 156 and 208 U). Aliquots were took out from all tests after 6, 12, 24, 36, 48 and 72 hours of reaction. To evaluate the time influence in galactooligosaccharides syntesis, it was realized a kinetic curve to measure the production in 3, 6, 9, 12, 18, 24, 36, 48

and 72 hours of reaction. The screening of microorganisms resulted in 5 galactooligosaccharides producer strains: *Aspergillus sp* (LB-01), *Aspergillus sp* (LB-32), *Aspergillus sp* (LB-36), *Penicillium sp* (LB-51) and *Scopulariopsis sp* (LB-35). The largest producer of 4'galactosil-lactose was *Aspergillus sp* (LB-32), that has converted 19,17% of lactose actual midst and has produced 7,25% of the tetrasaccharide. The second best producer was *Penicillium sp* (LB-51) with 6,71% of production, followed by *Scopulariopsis sp* (LB-35) with 6,65%, *Aspergillus sp* (LB-01) with 5,22% and *Aspergillus sp* (LB-36) with 4,97% of galactooligosaccharides production. The study of the fermentative process was realized with the microorganisms: *Aspergillus sp* (LB-32), *Penicillium sp* (LB-51) and *Scopulariopsis sp* (LB-35). During the experiment, it could be noticed that some treatments promoted the growth of the microorganisms, while others were disadvantageous. The control treatment T9 (that consists of 30 °C, 0% of lactose concentration in medium and 50% of humidity) was the best, with the biggest activity values for all microorganisms. The other treatments showed enzymatic activity values significantly poorer ( $p < 0,05$ ) than the values obtained in control treatment. The results of the enzymatic characterization showed that, for the microorganism *Aspergillus sp* (LB-32), higher temperatures (65 °C) and lower pH values (pH 4) promoted the production of 4'galactosil-lactose. The initial lactose concentration of 50% was disadvantageous because of lactose precipitation, being the best production of galactooligosaccharide with 40% of initial lactose. The increase in the enzymatic concentration was directly proportional to the increase of 4'galactosil-lactose production, obtaining the best result with 208 U of enzyme. All the tests showed the best results in 48 hours of reaction. The kinetic curve showed that the production of galactooligosaccharides starts after 3 hours of reaction, and reaches the top of production in 48 hours. Our best result was obtained using 65 °C of temperature, producing 12,10% of 4'galactosil-lactose through 31,27% of lactose conversion.

Key words: Screening, functional foods, prebiotics, oligosaccharides,

galactooligosaccharides,  $\beta$ -galactosidase, *Aspergillus* sp, *Penicillium* sp, *Scopulariopsis* sp.



## INTRODUÇÃO GERAL

Os galactooligosacarídeos (GOS) são considerados ingredientes naturais de alimentos e, devido aos efeitos benéficos na proliferação das bifidobactérias no cólon humano, são classificados como prebióticos. São açúcares encontrados naturalmente em muitos alimentos como frutas, vegetais, leite e mel, e não apresentam somente a função nutricional ou de adoçante, mas também exibem atividade fisiológica, sendo assim denominados de alimentos funcionais (NAKANO, 1998).

Desde a década de 80 há um grande interesse por alimentos funcionais, capazes de melhorar a saúde, a performance física ou a capacidade mental, além de possuírem valor nutricional (BEKERS *et al.*, 2004). Desta maneira, nos últimos anos, os oligossacarídeos têm atraído a atenção dos pesquisadores pois, além de seus usos tradicionais como fonte de energia e adoçante, são utilizados também como ingredientes funcionais, apresentando grande potencial para melhorar a qualidade de muitos alimentos. São capazes de promover uma modificação no *flavor*, nas características físico-químicas e apresentam propriedades benéficas para a saúde do consumidor (CRITTENDEN e PLAYNE, 1996).

Nos últimos anos o interesse e consumo de oligossacarídeos tem crescido muito, particularmente no Japão e Europa. Em 1991 o governo japonês criou o termo FOSHU (Food for Specified Health Use) para os alimentos funcionais. Em 1996 havia 58 alimentos listados, e entre estes 34 incorporavam oligossacarídeos (CRITTENDEN e PLAYNE, 1996). Em 2003 foram mais de 300 alimentos relatados como FOSHU, sendo que 30% destes apresentavam oligossacarídeos em sua formulação (TANIGUSHI, 2004).

Os açúcares dos alimentos são determinantes para a composição da microbiota intestinal (SAKO *et al.*, 1999). Os carboidratos que participam da dieta podem ser classificados com base nas propriedades fisiológicas em digeríveis ou não-digeríveis, havendo três principais tipos de carboidratos não-digeríveis: os polissacarídeos não-amídicos, os amidos resistentes e os oligossacarídeos não-

digeríveis (VORAGEM, 1998), estando nesse grupo os galactooligossacarídeos (GOS).

Os GOS apresentam configuração  $\beta$  e as enzimas digestivas gastrointestinais humanas são principalmente específicas para ligações  $\alpha$ , sendo então resistentes à digestão e absorção no intestino atingindo o cólon, onde são fermentados, promovendo um aumento das bifidobactérias (SAKO *et al.*, 1999) e redução das bactérias deterioradoras, conseqüentemente ocasionando efeitos benéficos para a saúde humana com a redução de metabólitos tóxicos (MODLER, 1994, TOMOMATSU, 1994). A ingestão de GOS aumenta a mineralização óssea e a resistência contra fraturas, devido a estimulação da absorção de cálcio (BROUNS e VERMEER, 2000). São usados em confeitos, gomas de mascar, iogurtes e bebidas como açúcares de baixa cariogenicidade, pois não são metabolizados pela microbiota bucal para formar ácidos e poliglucanas.

A formação de GOS a partir de lactose é influenciada por diversos fatores como a fonte e concentração da enzima, pH, temperatura e concentração do substrato (MAHONEY, 1998, RUSTOM *et al.*, 1998). MARTÍNEZ-VILLALEUNGA e colaboradores (2008) estudaram a otimização das condições para produção de GOS utilizando as variáveis temperatura, pH, concentração enzimática e concentração de lactose.

Através das considerações acima levantadas elucida-se a importância de isolar e avaliar novas linhagens fúngicas para a produção de GOS, e o estudo dos parâmetros do processo, visando obter um processo factível para a produção deste importante ingrediente para a indústria alimentícia.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivos Gerais**

Este trabalho teve como objetivo isolar novas linhagens fúngicas produtoras da enzima  $\beta$ -Galactosidase e estudar as condições para a produção de galactooligossacarídeos.

### **Objetivos Específicos**

Selecionar novas linhagens fúngicas produtoras da enzima  $\beta$ -Galactosidase com alta atividade de transgalactosilação.

Estudar a produção da enzima  $\beta$ -Galactosidase por fermentação semi-sólida utilizando o substrato farelo de trigo.

Estudar a produção de galactooligossacarídeos utilizando o extrato enzimático bruto liofilizado.

Avaliar o efeito da temperatura, umidade e concentração de lactose no processo fermentativo para a produção enzimática.

Caracterizar a enzima  $\beta$ -Galactosidase quanto ao efeito da temperatura, pH, concentração de lactose, concentração enzimática e tempo na produção de galactooligossacarídeos.





## **CAPÍTULO 1:**

### **GALACTOOLIGOSSACARÍDEOS: EFEITOS BENÉFICOS E PRODUÇÃO**



## **GALACTOOLIGOSSACARÍDEOS: EFEITOS BENÉFICOS E PRODUÇÃO**

**Rodrigues, Daniele; Pastore, Gláucia Maria**

Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos,  
Universidade Estadual de Campinas, CEP 13083-862 – Campinas-SP.

### **RESUMO**

Vários oligossacarídeos são encontrados em muitos alimentos. Alguns, além da função nutricional, também apresentam atividade fisiológica. Os galactooligossacarídeos são carboidratos não digeríveis, sendo resistentes às enzimas digestivas e fermentados por bifidobactérias ao atingir o cólon. Apresentam diversos benefícios devido às suas características físico-químicas e fisiológicas. Nas indústrias, são importantes por melhorarem a qualidade dos alimentos promovendo uma modificação no flavour. Dentre todos os benefícios obtidos com a ingestão de galactooligossacarídeos, o de maior importância é elevar a população de bifidobactérias no cólon e, por efeito antagônico, suprimir a atividade de bactérias deterioradoras e reduzir a formação de metabólitos tóxicos. Os galactooligossacarídeos são produzidos a partir da lactose por ação da enzima  $\beta$ -galactosidase com atividade de transgalactosilação. Este trabalho tem como objetivo realizar uma revisão bibliográfica a respeito da importância dos galactooligossacarídeos na nossa dieta, levantando as principais vantagens obtidas com a ingestão desse ingrediente, bem como relatar sua importância na indústria de alimentos.

Termos de indexação: alimentos funcionais, prebióticos, oligossacarídeos, galactooligossacarídeos,  $\beta$ -galactosidase.

### **ABSTRACT**

Many types of oligosaccharides are found in a large quantity of common foods. Some of them act not only as nutrients, but also exhibit physiological activities. Galactooligosaccharides are non-digestible carbohydrates, which are resistant to gastrointestinal digestive enzymes and are fermented by bifidobacteria in the colon. They offer many benefits due to their physicochemistry and physiological characteristics. In industries, they are important because they improve the food quality promoting a flavour modification. Among the benefits obtained with galactooligosaccharides ingestion, the most important is to increase the bifidobacteria population in the colon and, by their antagonistic effect, to suppress the activity of deteriorative bacteria and to reduce the formation of toxic fermentation products. Galactooligosaccharides are produced from lactose by the action of  $\beta$ -galactosidase enzyme that has transgalactosylation activity. The aim of this work was to realize a bibliographic review about the galactooligosaccharide

importance in our diet, showing the principal advantages obtained with the ingestion of this ingredient, over to tell your importance in food industry.

Key words: functional foods, prebiotics, oligosaccharides, galactooligosaccharides,  $\beta$ -galactosidase.

## 1. INTRODUÇÃO

A prática de alimentar-se saudavelmente é uma tendência atual. O aumento da consciência dos consumidores em melhorar a qualidade de vida e consumir produtos que ofereçam além dos nutrientes tradicionais, é um dos vários fatores que têm contribuído para o desenvolvimento dos alimentos funcionais (MORAES e COLLA, 2006). Os galactooligosacarídeos estão entre os ingredientes alimentares mais freqüentemente usados no desenvolvimento de produtos devido suas características físico-químicas e funcionais. São classificados como oligossacarídeos não-digeríveis (NDOs) e, portanto, como prebióticos. Apresentam não só a função nutricional ou de adoçante, mas também exibem atividades fisiológicas, sendo assim denominados ingredientes funcionais (NAKANO, 1998). Dentre os benefícios da ingestão de galactooligosacarídeos estão o aumento da população de bifidobactérias no cólon e, com isso, a redução dos níveis de bactérias patogênicas, além do aumento da absorção de cálcio e a redução do risco de câncer de cólon (ROBERFROID, 2007). Possuem características físico-químicas bastante desejáveis para as indústrias pois são capazes de melhorar as qualidades sensoriais dos alimentos. São usados na fabricação de gomas de mascar, confeitos, iogurtes e bebidas como açúcares de baixa cariogenicidade, pois não são metabolizados pela microflora bucal para formar ácidos e poliglucanas. Os galactooligosacarídeos são produtos da ação da enzima  $\beta$ -galactosidase, que realiza a reação de transgalactosilação da lactose produzindo oligômeros de cadeias de diferentes comprimentos (PRENOSIL *et al.*, 1987). Diversos trabalhos na literatura avaliam a produção desse ingrediente,

utilizando distintas linhagens, assim como processos diferenciados.

Este trabalho tem como objetivo realizar uma revisão bibliográfica a respeito da importância dos galactooligosacarídeos na nossa dieta, levantando as principais vantagens obtidas com a ingestão desse ingrediente, bem como relatar também sua importância na indústria de alimentos.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. ALIMENTOS FUNCIONAIS E PREBIÓTICOS

Atualmente, a preocupação com a alimentação e a saúde, bem como suas interações, tem aumentado em nossa sociedade. O consumidor tem mostrado interesse cada vez maior por alimentos que possam trazer algum benefício adicional em relação ao produto tradicionalmente comercializado. Com o aumento na expectativa de vida da população, aliado ao crescimento exponencial dos custos médico-hospitalares, a sociedade necessita vencer novos desafios, através do desenvolvimento de novos conhecimentos científicos e de novas tecnologias que resultem em modificações importantes no estilo de vida das pessoas. A nutrição precisa se adaptar a esses novos desafios, através do desenvolvimento de novos conceitos. A nutrição otimizada é um desses novos conceitos, dirigida no sentido de maximizar as funções fisiológicas de cada indivíduo, de maneira a assegurar tanto o bem-estar quanto a saúde, como também o risco mínimo de desenvolvimento de doenças ao longo da vida. Nesse contexto, os alimentos funcionais e especialmente os *probióticos* e *prebióticos* são conceitos novos e estimulantes (ROBERFROID, 2002).

Os alimentos funcionais, que são aqueles capazes de melhorar a saúde, a performance física ou a capacidade mental, além de possuírem valor nutricional, fazem parte de uma nova concepção de alimentos, denominada FOSHU (*Food for Specified Health Use*), lançada pelo Japão na década de 80 por meio de um

programa de governo que tinha como objetivo desenvolver alimentos saudáveis para uma população crescente de idosos, que apresentava uma grande expectativa de vida e que gerava uma preocupação, tanto da população quanto do governo, em prevenir doenças crônicas e degenerativas (MORAES e COLLA, 2006). Este grupo de alimentos foi definido como alimentos convencionais que apresentavam benefícios à saúde se consumido regularmente como parte de uma dieta saudável. A primeira geração de alimentos funcionais foi composta por vitaminas e sais como o cálcio, mas logo passou-se a direcionar esta classe de alimentos aos que proporcionavam efeito positivo na composição da microbiota intestinal. Ainda no início houve grande concentração dos estudos em alimentos probióticos, alimentos que contêm microrganismos vivos capazes de colonizar o cólon, como os *Lactobacillus* sp, *Enterococcus faecalis* e *Bifidobacteria* sp (HARTEMINK, 1997). A partir de então foi observado um crescente interesse por alimentos funcionais.

Existem vários conceitos para alimentos funcionais. De acordo com a Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério de Saúde (Portaria número 398 de 30/04/99), alimento funcional é “todo aquele alimento ou ingrediente que, além das funções nutricionais básicas, quando consumido como parte da dieta usual, produz efeitos metabólicos e/ou fisiológicos e/ou efeitos benéficos à saúde, devendo ser seguro para consumo sem supervisão médica”. Para NEUMANN *et al.* (2000), alimento funcional é todo alimento ou constituintes de alimentos e bebidas que ofereçam efeito saudável, além de seu valor nutritivo inerente à sua composição química, podendo desempenhar um papel vantajoso na prevenção e tratamento de doenças.

Esses alimentos possuem potencial para promover a saúde através de mecanismos não previstos através da nutrição convencional, devendo ser salientado que esse efeito restringe-se à promoção da saúde e não à cura de doenças (SANDERS, 1998).

A prática de alimentar-se saudavelmente é uma tendência atual. O aumento da consciência dos consumidores em melhorar a qualidade de vida e consumir

produtos que ofereçam além dos nutrientes tradicionais é um dos vários fatores que têm contribuído para o desenvolvimento dos alimentos funcionais (MORAES e COLLA, 2006).

O trato gastrointestinal humano é um micro-ecossistema cinético que possibilita o desempenho normal das funções fisiológicas do hospedeiro, a menos que microrganismos prejudiciais e potencialmente patogênicos predominem. Manter um equilíbrio apropriado da microbiota pode ser assegurado por uma suplementação sistemática da dieta com probióticos, prebióticos e simbióticos (BIELECKA *et al.*, 2002). Em virtude desse fato, nos últimos anos, o conceito de alimentos funcionais passou a concentrar-se de maneira intensiva nos aditivos alimentares que podem exercer efeito benéfico sobre a composição da microbiota intestinal (ZIEMER e GIBSON, 1998). Os prebióticos e os probióticos são atualmente os aditivos alimentares que compõem esses alimentos funcionais.

Existe ainda uma crença generalizada de que, apesar da ingestão alimentar poder regular determinadas atividades metabólicas associadas com microrganismos intestinais, uma alteração na dieta gera pouco efeito sobre a composição e estrutura da microbiota da flora intestinal humana (MACFARLANE e MACFARLANE, 2003). No entanto, a introdução de prebióticos na dieta nos últimos anos tem suscitado um sério desafio para este conceito, e está sendo cada vez mais reconhecido que a composição de espécies da microbiota, bem como muitas das suas características fisiológicas, pode ser modificado por relativamente pequenas alterações no consumo alimentar (MACFARLANE *et al.*, 2007).

A definição original de um prebiótico foi apresentada por GIBSON e ROBERFROID, em 1995, como um "ingrediente alimentar não digerível que afeta benéficamente o hospedeiro por estimular seletivamente o crescimento e/ou atividade de um ou limitado número de bactérias no cólon e, portanto, melhora a saúde". Recentemente, ROBERFROID (2007) descreveu um prebiótico como "um ingrediente fermentado seletivo que permite específicas mudanças, tanto na composição e/ou na atividade da microbiota gastrointestinal, e confere benefícios

para bem-estar e saúde do hospedeiro“. Na prática, as bactérias beneficiadas pelo uso de prebióticos são quase que exclusivamente, *Bifidobacteria sp* e *Lactobacillus sp* (GIBSON *et al.* 1999; BOUHNİK *et al.* 2004). Atualmente, os alimentos prebióticos tornaram-se uma alternativa atraente de alimentos funcionais e, portanto, alvo de inúmeras pesquisas, principalmente devido às dificuldades encontradas na administração oral dos probióticos, que possuem baixa taxa de sobrevivência. Exemplos de prebióticos são galactooligossacarídeos, frutooligossacarídeos, arabinose, rafinose, manose, lactulose, estaquiose etc (BOSSCHER *et al.*, 2006). Segundo DEPEINT *et al.* (2008), muitos diferentes carboidratos não-digeríveis atendem às propriedades para serem classificados como prebióticos, portanto somente os frutooligossacarídeos e os galactooligossacarídeos foram testados *in vivo* para todos os requerimentos exigidos para ser um prebiótico.

Segundo GIBSON (2008), para um alimento ser considerado um prebiótico, ele deve obedecer alguns parâmetros, como (1) não deve sofrer hidrólise ou absorção no intestino delgado; (2) quando atingir o cólon, deve ser metabolizado seletivamente por um número limitado de bactérias benéficas; (3) deve ser capaz de alterar a microflora colônica para uma microflora bacteriana saudável; e (4) deve ser capaz de induzir efeito fisiológico que seja importante para a saúde. A Figura 1.1 mostra o comportamento dos prebióticos no trato gastrointestinal humano.



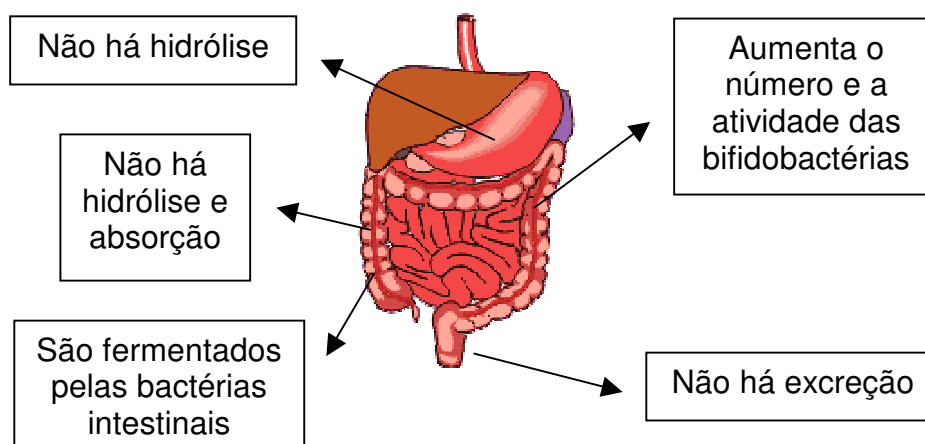


Figura 1.1 – Comportamento dos prebióticos no trato gastrointestinal humano (TUOHY *et al.*, 2005).

Recentemente, a FAO (Food and Agriculture Organization) das Nações Unidas recomendou novos critérios e metodologias para avaliar a segurança e a eficácia de um prebiótico. Segundo esta organização, um prebiótico é um componente alimentar que confere benefícios à saúde do hospedeiro associado com modulações na microbiota (PINEIRO *et al.*, 2008). Para um componente receber o título de prebiótico, ele deve obedecer alguns parâmetros, representados na Figura 1.2.

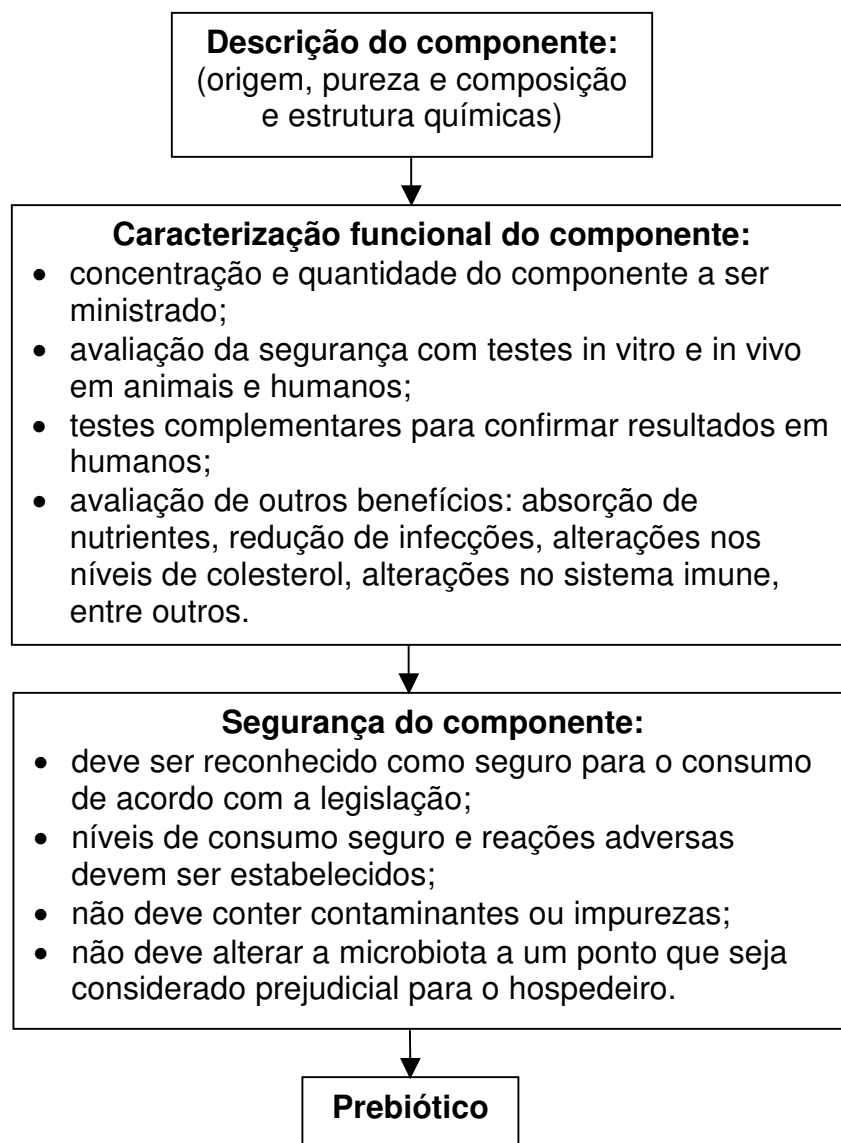


Figura 1.2 – Parâmetros estabelecidos pela FAO (Food and Agricultural Organization) para classificar um alimento como prebiótico. Adaptado de PINEIRO *et al.* (2008).

Os probióticos são outro tipo de alimentos considerados funcionais. São microrganismos (geralmente, *Bifidobacteria sp* e *Lactobacillus sp*) que, quando ingeridos, exercem efeitos benéficos para a saúde, produzindo compostos como as citocinas e o ácido butírico que são antimicrobianos e antibacterianos (MORAES e COLLA, 2006). Assim, favorecem a presença de bactérias benéficas

ao organismo e diminuem a concentração de bactérias e microrganismos indesejáveis. Porém, a vantagem do uso de prebióticos, é a ingestão de ingredientes que favorecem o desenvolvimento destes microrganismos específicos.

Embora os prebióticos e os probióticos possuam mecanismos de atuação em comum, especialmente quanto à modulação da microbiota endógena, eles diferem em sua composição e em seu metabolismo (Figura 1.3).

Os prebióticos, quando fermentados pela microbiota endógena, aumentam a produção de gás, apresentando o risco teórico de aumentar a diarreia em alguns casos devido ao efeito osmótico e de serem pouco toleráveis em pacientes com síndrome do intestino irritável. Entretanto, a tolerância de baixas doses de prebióticos é geralmente excelente (SAAD, 2006).

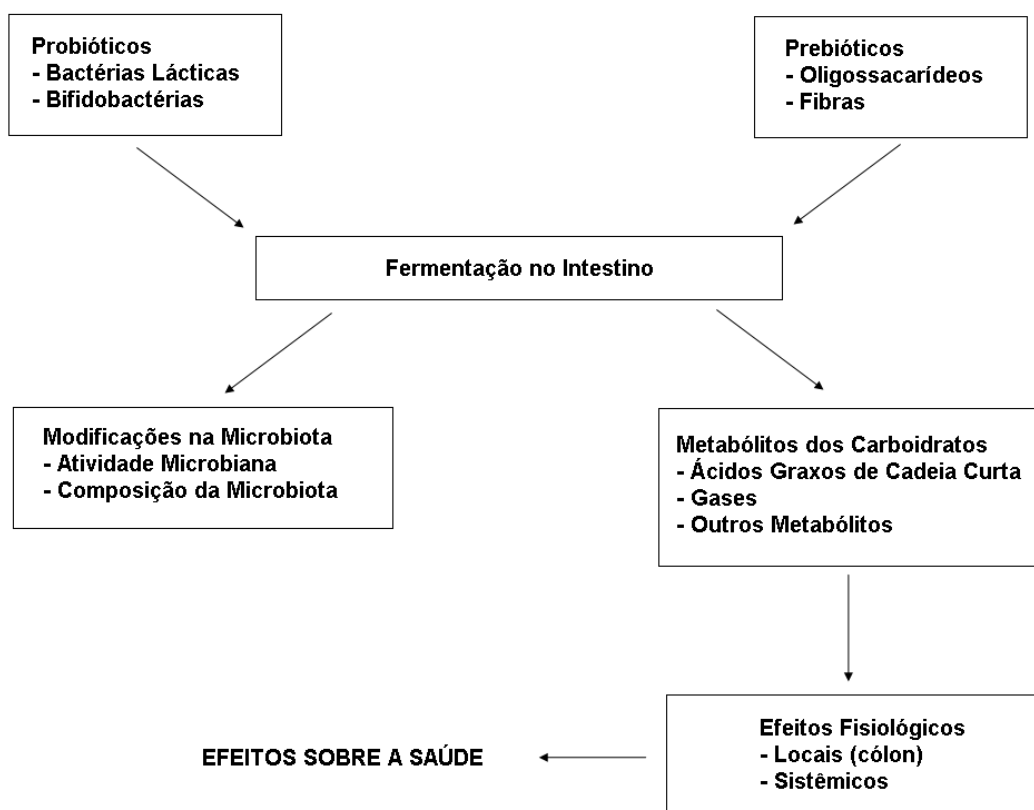


Figura 1.3 – Reações dos ingredientes alimentares probióticos e prebióticos com a microbiota intestinal, relativo a seus efeitos sobre a saúde. Adaptado de SAAD (2006).

Os prebióticos estão entre os ingredientes alimentares mais freqüentemente usados no desenvolvimento de produtos e possuem um grande potencial para pesquisas. O número de artigos sobre probióticos e prebióticos indexados na MEDLINE apresentou crescimento bastante expressivo, no período entre 1996 e 2005. A Figura 1.4 mostra o número de artigos publicados que continham as palavras probiótico e prebiótico em inglês [probiotic(s), prebiotic(s)]. O aumento anual no número de artigos denota o crescente interesse científico que os mesmos vêm recebendo na literatura das ciências da saúde. O Mercado europeu para prebióticos movimenta atualmente 87 milhões de euros e aumentará para 179,7 milhões em 2010. Esse crescimento é explicado pelo grande número de alimentos em que os prebióticos têm sido inseridos (PINEIRO *et al.*, 2008).

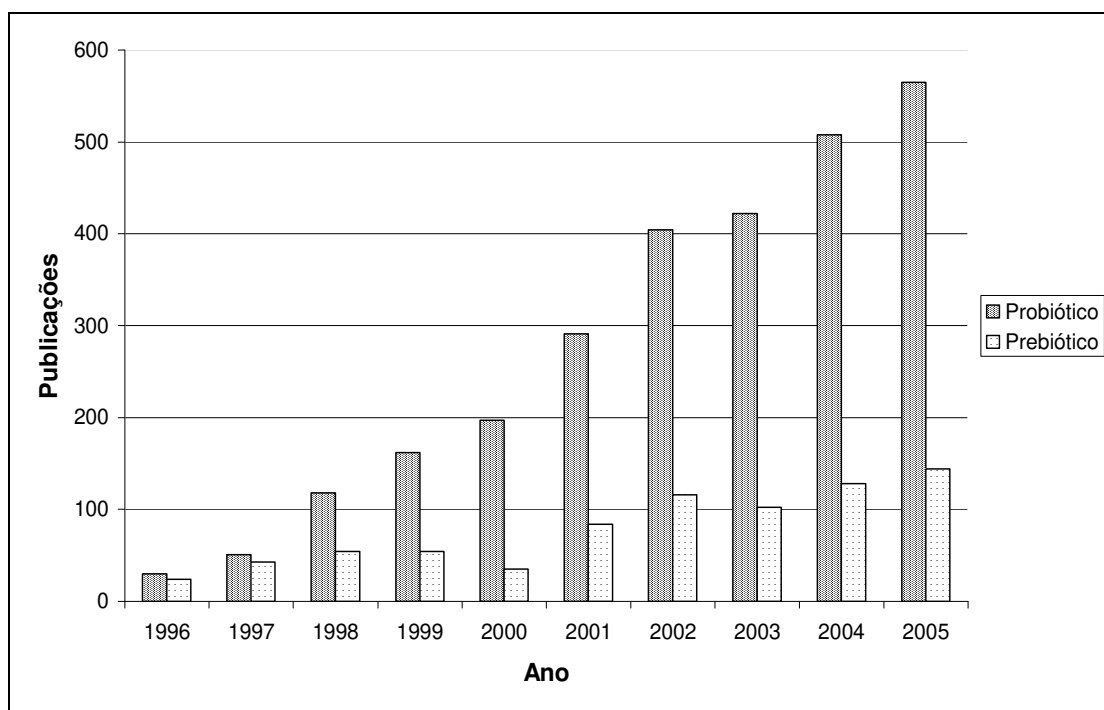


Figura 1.4 – Número de artigos na base de dados MEDLINE no período de 1996 a 2005, com a presença das palavras probióticos e prebióticos. Adaptado de MORAES e JACOB (2006).

Dentre os alimentos funcionais, destacam-se os oligossacarídeos, reconheciamos como prebióticos, que estão entre os ingredientes alimentares mais frequentemente usados no desenvolvimento de produtos e possuem um grande potencial para pesquisas. Nos últimos anos, os oligossacarídeos têm atraído a atenção dos pesquisadores pois, além de seus usos tradicionais como fonte de energia e adoçante, são utilizados também como ingredientes funcionais, apresentando grande potencial para melhorar a qualidade de muitos alimentos.

## 2.2. OLIGOSSACARÍDEOS

Os oligossacarídeos, classificados como alimentos não digeríveis (NDOs), são açúcares encontrados como componentes naturais em muitos alimentos como frutas, vegetais, leite e mel. Alguns destes não apresentam só a função nutricional ou de adoçante, mas também exibem atividades fisiológicas, sendo assim denominados ingredientes funcionais (NAKANO, 2007). Trata-se de cadeias glicosídicas formadas por 3 a 10 monossacarídeos (CRITTENDEN e PLAYNE, 1996).

Devido as suas características físico-químicas e bioquímicas, os oligossacarídeos têm encontrado aplicação na indústria de alimentos, tanto para produtos utilizados para alimentação humana (bebidas, adoçantes, leite em pó infantil) quanto para a alimentação animal (ração), além da aplicação em cosméticos, produtos farmacêuticos e produtos para diabéticos. Eles são capazes de melhorar a qualidade dos alimentos, pois promovem uma modificação no *flavor* e nas características físico-químicas (CRITTENDEN e PLAYNE, 1996).

Apesar dessas características serem muito desejáveis nos alimentos, são as características fisiológicas as responsáveis pelo grande interesse dos oligossacarídeos na indústria. Sua utilização com alimento funcional é proposta desde 1980, sendo que sua importância maior consiste no estímulo da produção de bifidobactérias, e por isso são considerados prebióticos. De acordo com NAKANO (2007), os fruto-, xilo- e oligossacarídeos estimulam a atividade de tais

bactérias no trato intestinal, sendo esta a principal alegação de tais produtos, de auxiliar a manter um bom desenvolvimento gastrointestinal.

A Figura 1.5 mostra a demanda de oligossacarídeos no Japão. O mercado para oligossacarídeos já é substancial e continua a expandir gradualmente, movimentando em torno de 20 bilhões de yens por ano, equivalente a 160 milhões de dólares por ano. Das empresas atuais, as japonesas dominam a produção mundial de oligossacarídeos, como mostram as pesquisas em desenvolvimento (NAKAKUKI, 2002).

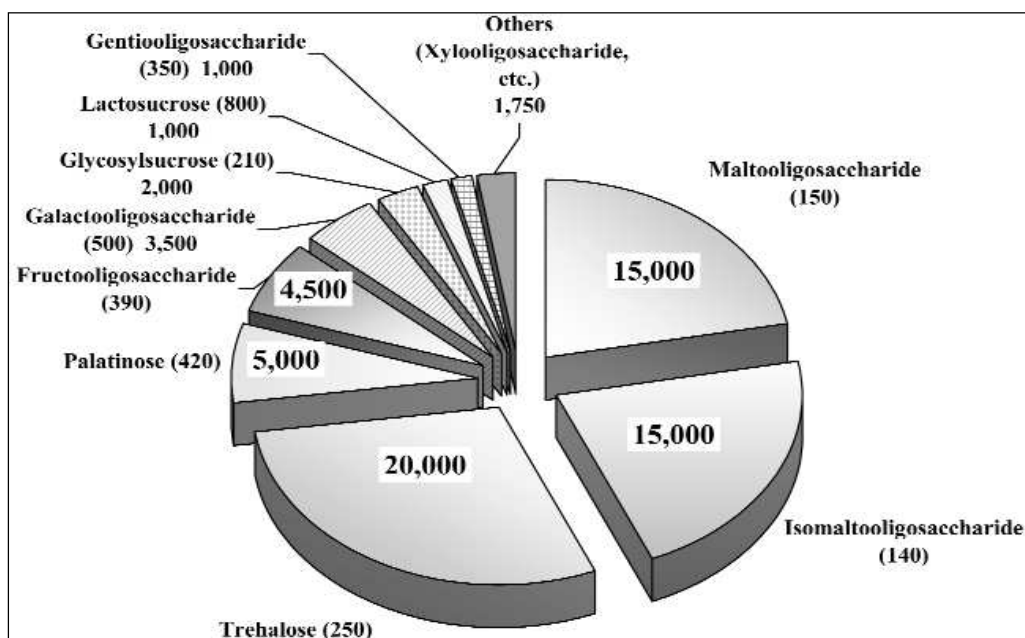


Figura 1.5 – Demanda de oligossacarídeos no Japão (toneladas/ano). ( ) Preço médio, em yens, por quilograma de cada produto. (NAKAKUKI, 2002).

Antigamente, acreditava-se que todos os alimentos não-digeridos eram excretados nas fezes, mas após alguns anos de estudos, observou-se que alguns destes alimentos eram fermentados por certos microrganismos da microbiota intestinal (CRITTENDEN e PLAYNE, 1996). Apesar de alguns peptídeos, proteínas e lipídeos serem prebióticos, foram os oligossacarídeos não digeríveis que receberam a atenção dos pesquisadores (ZIEMER e GIBSON, 1998). Para

que os oligossacarídeos tenham efeito prebiótico e, portanto, sejam resistentes às enzimas digestivas, eles devem possuir ligações glicosídicas específicas entre as unidades de açúcar, responsáveis por essa resistência. Essas ligações são hidrolisadas somente por grupos específicos e limitados de microrganismos do cólon que são benéficos à saúde (BIELECKA *et al.*, 2001). Entre os oligossacarídeos reconhecidamente prebióticos, tem-se os galactooligossacarídeos, frutooligossacarídeos, xilooligossacarídeos, entre outros.

Normalmente os oligossacarídeos de grau alimentar não são produtos puros, mas misturas contendo oligossacarídeos de diferentes graus de polimerização, como os polissacarídeos ou dissacarídeos e monômeros de açúcares, podendo ser produzidos quimicamente ou pelo uso de enzimas pela reação de transferência ou pelo controle de degradação enzimática de polissacarídeos de origem vegetal. A maioria é produzida em escala industrial e estão amplamente disponíveis no mercado mundial (GULEWICZ *et al.*, 2003).

Potenciais oligossacarídeos prebióticos podem ser classificados de acordo com os seus constituintes químicos e grau de polimerização (dp). No entanto, a grande maioria dos estudos sobre prebióticos incidiram sobre inulina, frutooligossacarídeos (FOS) e galactooligossacarídeos (GOS). Este último grupo de hidratos de carbono em particular, possui um histórico seguro de uso comercial e não estão classificados na categoria de novos alimentos (MACFARLANE *et al.* 2006).

FOS e GOS não são sensíveis ao ácido gástrico e não servem como substratos para as enzimas hidrolíticas no trato digestivo superior. O Japão foi o país pioneiro em adicionar FOS de cadeia curta, comercialmente disponível para gêneros alimentícios, e o “Neosugar” pode ser encontrado em mais de 500 produtos alimentícios (GUARNER, 2005).

### 2.3. PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E FUNCIONAIS DOS OLIGOSSACARÍDEOS

Os oligossacarídeos são solúveis em água e levemente doces, possuindo de 0,4 a 0,6 vezes o poder de doçura da sacarose. A doçura depende da estrutura química e da massa molecular, ou seja, do grau de polimerização, dos oligossacarídeos presentes, além também dos níveis de mono e dissacarídeos presentes na mistura (YUN, 1996). Quanto maior o comprimento da cadeia do oligossacarídeo, menor será a doçura.

A baixa doçura é desejável naqueles alimentos que necessitam de restrição de açúcares. O baixo poder adoçante é favorável na produção de alimentos em que a matriz, com reduzida doçura, é desejável para evidenciar outros “flavours” (CRITTENDEN e PLAYNE, 1996). Podem ser utilizados juntamente com adoçantes artificiais como o objetivo de mascarar o sabor residual deixado por esses adoçantes (NAKANO, 2007).

Possuem viscosidade e estabilidade térmica relativamente maiores que a sacarose nas mesmas concentrações, devido ao seu maior peso molecular, e portanto melhoram a textura e aumentam o corpo e a sensação do alimento na boca (CRITTENDEN e PLAYNE, 1996). São usados para alterar a temperatura de congelamento dos alimentos e controlar o nível de escurecimento devido a reação de Maillard em alimentos processados com o uso do calor. Ainda promovem uma retenção da umidade prevenindo a excessiva secagem e proporcionando uma baixa atividade de água, que é conveniente no controle de contaminação microbiana (MUSSATTO e MANCILHA, 2007).

Apesar das vantagens que as características físico-químicas podem fornecer ao alimento, os oligossacarídeos vêm chamando cada vez mais a atenção dos pesquisadores devido as suas características fisiológicas. Os oligossacarídeos, ao contrário do amido e dos monossacarídeos, não são utilizados pela microbiota bucal para formar ácidos e poliglucanas, e conseqüentemente são usados como açúcares de baixa cariogenicidade na



produção de confeitos, gomas de mascar, iogurtes e bebidas. Além disso, muitos oligossacarídeos não são digeridos por humanos, podendo ser utilizados em alimentos dietéticos para diabéticos.

A principal característica fisiológica dos oligossacarídeos é a promoção da proliferação da microbiota benéfica no cólon, sendo classificados como prebióticos. Além das propriedades físico-químicas desejáveis dos prebióticos, alguns efeitos funcionais podem ser citados como a modulação de funções fisiológicas chaves, como a absorção de cálcio e, possivelmente, o metabolismo lipídico, a modulação da composição da microbiota intestinal, a qual exerce um papel primordial na fisiologia gastrointestinal, e a redução do risco de câncer de cólon (ROBERFROID, 2007). Diversos estudos experimentais mostraram a aplicação da inulina e da oligofrutose como fatores bifidogênicos, ou seja, que estimulam a predominância de bifidobactérias no cólon. Conseqüentemente, há um estímulo do sistema imunológico do hospedeiro, uma redução nos níveis de bactérias patogênicas no intestino, um alívio da constipação, uma diminuição do risco de osteoporose resultante da absorção aumentada de minerais, particularmente o cálcio. Adicionalmente, haveria uma redução do risco de arteriosclerose, através da diminuição na síntese de triglicérides e ácidos graxos no fígado e diminuição do nível desses compostos no sangue (KAUR e GUPTA, 2002). A habilidade de muitos oligossacarídeos promoverem a proliferação das bifidobactérias no cólon tem sido muito estudada. Essas bactérias causam benefícios à saúde, dentre eles, a proteção contra infecções gastrointestinais, redução do pH intestinal pela assimilação de açúcares, supressão de bactérias patogênicas e putrefativas, produção de vitaminas, ativação da função intestinal, auxílio à digestão e estimulação do sistema imunológico (MIZOTA, 1996). A Figura 1.6 mostra a atuação dos prebióticos como fatores bifidogênicos.

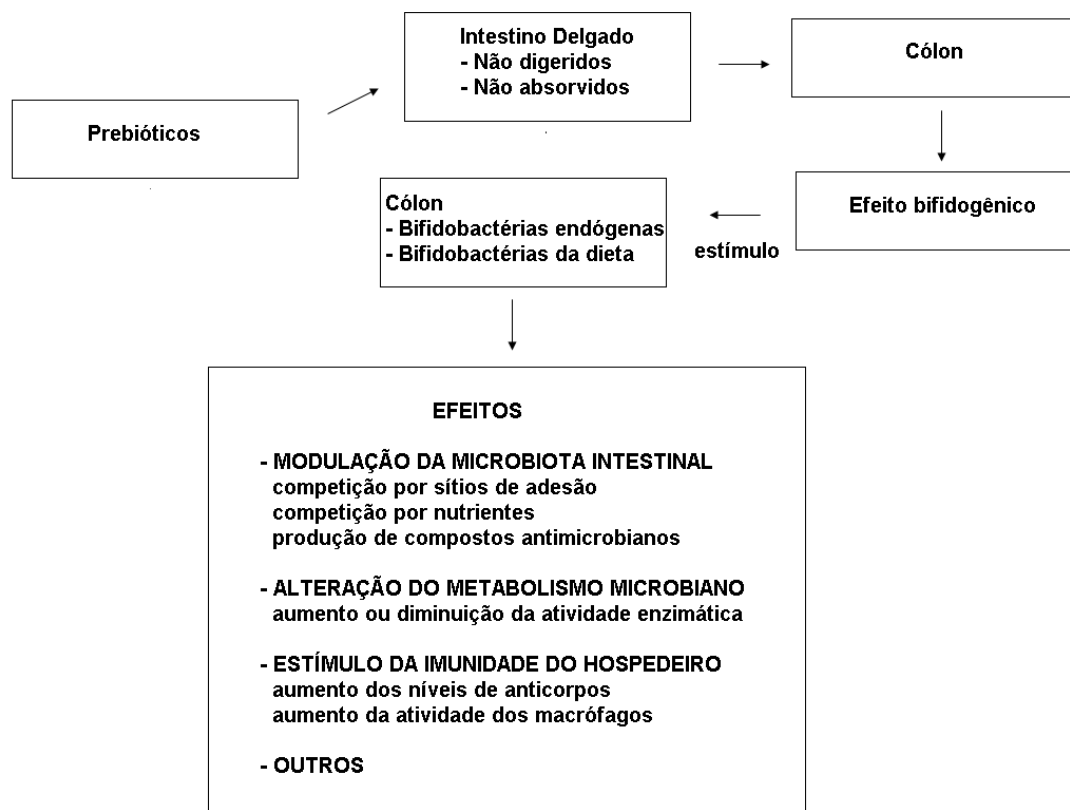


Figura 1.6 – Prebióticos como fatores bifidogênicos. Adaptado de SAAD (2006).

### 2.3.1. EFEITO BIFIDOGÊNICO E MELHORA DO HÁBITO INTESTINAL

Os galactooligossacarídeos são considerados fatores bifidogênicos, definidos como compostos que não são metabolizados pelo hospedeiro e alcançam o intestino para serem metabolizados por bifidobactérias. Segundo MACFARLANE *et al.* (2007), a suplementação da dieta com esses fatores resulta em um aumento na ocorrência e no número de bifidobactérias, e inibem o crescimento de bactérias patogênicas, putrefativas ou organismos que causam produção excessiva de gás. Em estudo realizado com 59 voluntários saudáveis, DEPEINT *et al.* (2008) observaram que a adição de 7 g/dia de galactooligossacarídeos na dieta aumentou significativamente a população de bifidobactérias quando comparada com voluntários que receberam somente a

fórmula placebo. Ao chegarem no cólon, os oligossacarídeos são utilizados como substrato de fermentação por diversas bactérias intestinais, produzindo ácido láctico e ácidos graxos de cadeia curta, diminuindo o pH intestinal e causando um efeito anti-bacteriano, inibindo assim o crescimento de bactérias patogênicas (SWENNEN *et al.*, 2006).

Esse ambiente com baixo valor de pH favorece também a vasodilatação e aumenta a absorção de água e sais, melhorando a sintomatologia de indivíduos com diarreias. Além disso, a amônia torna-se ionizada e não é absorvida por difusão passiva, influenciando os níveis sangüíneos e beneficiando indivíduos em tratamento de cirrose hepática (DELZZENE, 2003).

O aumento da população de bifidobactérias faz aumentar a retenção de umidade nas fezes, aumentando a massa fecal, favorecendo o peristaltismo e a melhora dos sintomas de constipação (LEMOS, 2008). De acordo com BOSSCHER *et al.* (2006), esse aumento da massa fecal ocorre devido à contribuição das células bacterianas, que possui alto conteúdo de água no interior de suas células.

### 2.3.2. SISTEMA IMUNOLÓGICO E DOENÇAS INFLAMATÓRIAS INTESTINAIS

Os prebióticos atuam indiretamente e de forma benéfica sobre o sistema imunológico, pois estimulam o crescimento de bactérias lácticas, que por sua vez produzem substâncias com propriedades imuno-estimulatórias, como lipopolissacarídeos, peptideoglicanas e ácidos lipoteicóicos, que interagem com o sistema imune e induzem a produção de citocinas, a proliferação de células mononucleares, a fagocitose macrófaga e a síntese de grandes quantidades de imunoglobulinas, principalmente a IgA (LEMOS, 2008). Segundo GIBSON (2008), os probióticos e os prebióticos possuem a habilidade de aumentar a resistência contra patógenos. Existem 3 mecanismos pelos quais os probióticos reduzem infecções intestinais: 1) os produtos metabólicos excretados por esses microrganismos, como os ácidos, podem baixar o pH intestinal para níveis abaixo

àqueles suportados pelos microrganismos patogênicos; 2) as bactérias lácticas e bifidobactérias são capazes de excretar antibióticos naturais; 3) existe a competição por nutrientes e sítios de colonização.

Os oligossacarídeos podem aumentar a resistência à colonização por elementos patogênicos, atuando na modulação do sistema imunológico e ajudando a reduzir o risco de infecções gastrointestinais (NAKAMURA *et al.*, 2004). Em estudo realizado com pacientes com síndrome do intestino irritável, SILK *et al.* (2008) comprovou que a administração de 3,5 g/dia de galactooligossacarídeos fez aumentar a quantidade de bifidobactérias e aliviou os sintomas da doença.

Também podem diminuir reações alérgicas e induzir um efeito barreira no intestino gerando benefícios para o metabolismo (BRUZZESE *et al.*, 2006). Segundo SILVA e NÖRNBERG (2003), estes compostos se ligariam a sítios receptores dos macrófagos através do reconhecimento de determinados açúcares, presentes nas glicoproteínas da superfície epitelial, desencadeando uma reação em cascata que resultaria na ativação dos macrófagos e liberação de citocinas, ativando a resposta imune adquirida.

### 2.3.3. INIBIÇÃO DO CÂNCER DE CÓLON

O câncer de cólon é uma das causas mais importantes de morbidade e mortalidade por câncer entre homens e mulheres. Criptas aberrantes são lesões precursoras putrefativas, a partir das quais os adenomas e carcinomas podem se desenvolver no cólon (SAAD, 2006). As propriedades imunomoduladoras de prebióticos podem proporcionar a prevenção do desenvolvimento ou progressão da neoplasia, através da redução da inflamação, reforçando a função imunológica, reduzindo a síntese de enzimas que metabolizam pró-carcinógenos em cancerígenas, e atividade anti-tumoral. No entanto, existem poucos dados epidemiológicos relativos aos efeitos específicos anti-câncer de carboidratos fermentáveis e da microbiota intestinal em seres humanos. Todos os dados

experimentais sobre a inibição da carcinogênese provém de estudos *in vitro*, ou de ensaios em animais (MACFARLANE *et al.*, 2007).

Resultados de ensaios com animais são encorajadores, pois demonstram que os prebióticos apresentam uma capacidade de reduzir o número de criptas aberrantes no cólon. No entanto, transferir esses resultados em ensaios clínicos em humanos para retardar ou impedir o crescimento tumoral, direta ou indiretamente, é um grande desafio para o futuro. A ingestão de prebióticos sozinho, ou, mais provavelmente, em combinação com probióticos, podem vir a fornecer proteção contra o desenvolvimento ou re-ocorrência de câncer, embora ainda não exista evidências em humanos de que os prebióticos sejam capazes de prevenir a iniciação do câncer de cólon (WOLLOWSKI *et al.*, 2001).

Alguns autores relatam também que esse efeito anti-cancerígeno está relacionado com a formação de ácidos graxos de cadeia curta (ácido propiônico, butírico e acético), que resulta no abaixamento do pH intestinal, tornando o meio seletivo para o crescimento das bifidobactérias e bactérias lácticas, inibindo assim o crescimento de bactérias do gênero *Clostridium sp*, *Salmonella sp*, *Shigella sp*, *Campilobacter sp*, *Listeria sp*, coliformes, bacteróides e outros. Com a diminuição do número de bactérias putrefativas no intestino, diminui também a ocorrência de substâncias tóxicas, contribuindo na prevenção de câncer de cólon (HAULY e MOSCATTO, 2002). Lemos (2008) acrescenta que as bifidobactérias e lactobacillus produzem bacteriocinas que impedem o desenvolvimento de microrganismos patogênicos.

#### 2.3.4. ESTÍMULO DA BIODISPONIBILIDADE DE DETERMINADOS MINERAIS

A massa óssea de um adulto é dependente tanto da adequada ingestão, assim como a biodisponibilidade de cálcio. Um déficit em qualquer destes pontos pode resultar em osteoporose, associado principalmente com o aumento da idade e mulheres pós-menopausa (MELTON *et al.*, 1993; SNELLING *et al.*, 2001). Atualmente, o tratamento e prevenção da osteoporose são limitados ao aumento

da ingestão de cálcio, ou através do estímulo da formação óssea e redução da reabsorção óssea.

Diversos estudos com ratos e hamsters e alguns com humanos mostraram que prebióticos podem aumentar a biodisponibilidade de cálcio (ROBERFROID, 2002). Em estudo realizado com 100 adolescentes, ABRANS *et al.* (2005) constataram que 8 g/dia de inulina durante 1 ano mostrou um significativo aumento na absorção de cálcio, proporcionando uma melhora na densidade óssea. O aumento da biodisponibilidade do cálcio poderia ser devido à transferência desse mineral do intestino delgado para o grosso e do efeito osmótico do prebiótico, o qual resultaria na transferência de água para o intestino grosso, permitindo, assim, que o cálcio se torne mais solúvel. A melhor biodisponibilidade do cálcio no cólon poderia ser, também, resultante da hidrólise do complexo cálcio-fitato, por ação de fitases liberadoras de cálcio bacterianas. A melhor absorção foi associada à diminuição de pH nos conteúdos do íleo, ceco e cólon, devido a formação de ácido láctico e ácidos graxos de cadeia curta, aumentando a solubilidade dos minerais, tornando-os mais facilmente absorvidos pela célula da mucosa (LEMOS, 2008). Essa diminuição resulta em aumento na concentração de minerais ionizados, condição esta que facilita a difusão passiva, a hipertrofia das paredes do ceco e o aumento da concentração de ácidos graxos voláteis, sais biliares, cálcio, fósforo, fosfato e, em menor grau, magnésio, no ceco (KAUR e GUPTA, 2002).

### 2.3.5. INFLUÊNCIA SOBRE O METABOLISMO LIPÍDICO

Estudos sob o efeito de prebióticos sob o metabolismo lipídico também estão sendo avaliados. Várias experiências com animais indicam o potencial de prebióticos para influenciar positivamente nos níveis lipídicos séricos (FIORDALISO *et al.*, 1995; RAULT-NANIA *et al.*, 2006). Em seus estudos, ORTUÑO *et al.* (2009) verificaram que houve um aumento nos índices de HDL no sangue de ratos alimentados com prebióticos, bem como um aumento na absorção de ferro e redução da população de enterobactérias. Através dos

resultados alcançados sob os níveis de colesterol total, de lipoproteína de alta densidade (HDL) e lipoproteína de baixa densidade (LDL), conclusões definitivas ainda não podem ser tiradas. Segundo MACFARLANE *et al.* (2007), alguns estudos mostraram não haver diferenças significativas, outros demonstraram uma redução significativa no LDL, enquanto alguns indicaram reduções nas concentrações de colesterol total triacilglicerol. LEMOS (2008) defende a teoria de que as bactérias lácticas, incluindo as Bifidobactérias, reduzem o colesterol sérico total e aumentam a razão do colesterol HDL: colesterol LDL. Este efeito pode ser explicado pela teoria de que as Bifidobactérias consomem parte do colesterol que chega ao intestino, diminuindo a quantidade absorvida pela parede intestinal e que passa para o sangue.

#### 2.4. PROPRIEDADES DA ENZIMA $\beta$ -GALACTOSIDASE E PRODUÇÃO BIOTECNOLÓGICA DE GALACTOOLIGOSSACARÍDEOS

A enzima  $\beta$ -galactosidase é classificada como uma hidrolase, com capacidade de transferase para grupos galactosil, catalisando o resíduo terminal  $\beta$ -galactopiranosil da lactose ( $\text{Gal}\beta 1 - 4\text{Glc}$ ) para formar glicose e galactose (BLANCH e CLARK, 1997; HOLSINGER, 1997). Popularmente conhecida como lactase ou formalmente como  $\beta$ -D-galactosideogalactohidrolase, é uma das enzimas mais estudadas e relatadas na literatura. (GÉKAS e LOPEZ-LEIVA, 1985; HOLSINGER, 1997; MAHONEY, 1997). Com poucas exceções, as  $\beta$ -galactosidases são sintetizadas intracelularmente por microrganismos que utilizam o açúcar para produzir energia durante a fermentação (BECERRA *et al.*, 2001). Durante o processo fermentativo, a formação da  $\beta$ -galactosidase pode ser influenciada por diversos fatores como a temperatura, a umidade e a presença de lactose no meio. As  $\beta$ -galactosidases atuam também como catalisador biológico da reação que hidrolisa ligações  $\beta$ -galactosil em glicoproteínas, polissacarídeos, dissacarídeos, e compostos tais como orto e para-nitrofenil- $\beta$ -D-galactosídeos, sendo esse dois últimos usados para determinar a atividade de  $\beta$ -galactosidase

(BLANCH e CLARK, 1997). Segundo PRENOSIL *et al.* (1987), o mecanismo de hidrólise da lactose foi descrito pela primeira vez em 1960 por WALLENFELS e MALHOTRA utilizando lactase produzida por *Escherichia coli*.

A Figura 1.7 mostra um processo industrial para galactooligossacarídeos. A lactose utilizada como substrato, refinada de soro de leite de vaca, sofre ação da  $\beta$ -galactosidase para produzir galactooligossacarídeos. Comercialmente, os galactooligossacarídeos são misturas de várias espécies moleculares de oligossacarídeos (mais que 55%), lactose (aproximadamente 20%), glicose (aproximadamente 20%) e uma pequena quantidade de galactose, são comercializados na forma líquida ou em pó.

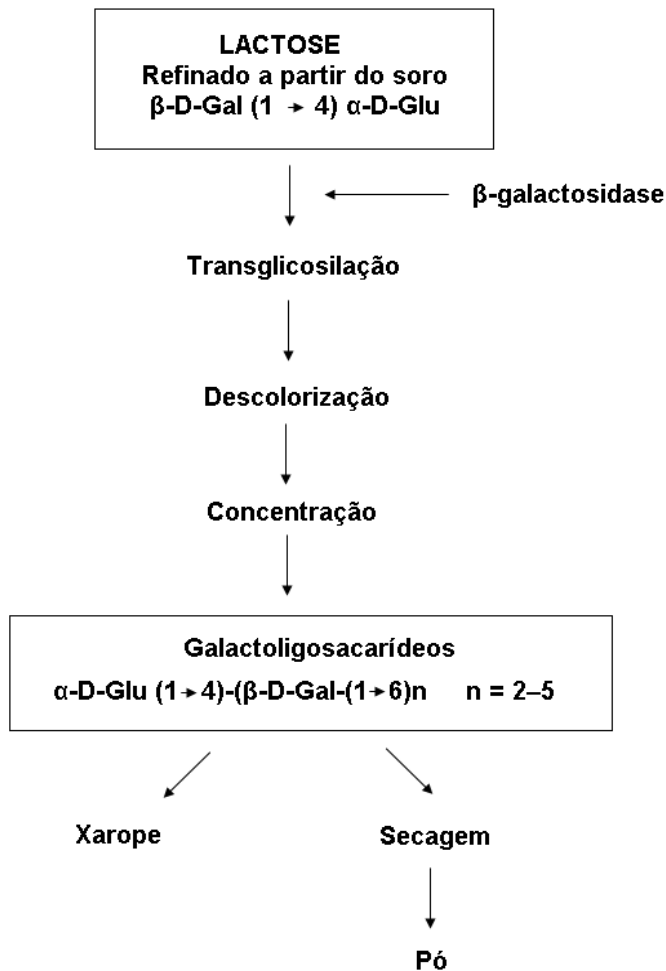


Figura 1.7 – Esquema de diagrama mostrando a produção de galactooligossacarídeos a partir de lactose. Adaptado de ANGUS *et al.* (2005).



Os galactooligosacarídeos (GOS), classificados como oligossacarídeos não-digeríveis (NDOs) e, portanto, como prebióticos, são principalmente formados pela reação de transgalactosilação da lactose pela enzima  $\beta$ -galactosidase, sendo produzidos oligômeros de cadeias de diferentes comprimentos (PRENOSIL *et al.*, 1987). São compostos por moléculas de galactose ligadas à lactose, sendo formados de tri a hexassacarídeos com 2 a 5 unidades de galactose unidas por ligações  $\beta$  (SAKO *et al.*, 1999). Nos galactooligossacarídeos produzidos à 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. As ligações glicosídicas entre as unidades de galactose geralmente são  $\beta$ -1,4 ou  $\beta$ -1,6 dependendo de qual microrganismo a  $\beta$ -galactosidase foi produzida.

As enzimas podem ser sintetizadas a partir de vários fungos, leveduras e bactérias, que podem ser imobilizadas sobre resinas de troca iônica, quitosana, celulose ou materiais fibrosos, tais como panos de algodão, o que leva à formação GOS de diferentes produtos (Tabela 1.1).



Tabela 1.1 – Estudos utilizando diferentes microrganismos para a produção de galactoligossacarídeos (GOS) a partir de lactose.

<b>Microrganismos</b>	<b>Sistema</b>	<b>Rendimento</b>	<b>Resultados do Estudo</b>	<b>Referência</b>
<i>Aspergillus oryzae</i>	Enzima imobilizada em pano de algodão	Produção de GOS de 27% (m/m) da lactose inicial, com 50% de conversão da lactose. 70% do GOS produziram trissacarídeos	A imobilização em pano de algodão não afetou as características da enzima. Estabilidade térmica aumentou após a imobilização. Rendimento foi superior aos citados anteriormente.	Albayrak e Yang (2002)
<i>Talaromyces thermophilus</i>	Enzima imobilizada	Rendimento máximo 34% com 80% de lactose conversão	A imobilização aumentou a termoestabilidade da enzima	Nakkharat e Haltrich (2006)
<i>Lactobacillus teuteri</i>	-	Produção de GOS de 38% com aprox. 80% de conversão de lactose. Maioria dos produtos são dissacarídeos, diferentes da lactose	Não há formação de produtos com ligações $\beta$ -1.4	Splechtna <i>et al.</i> (2006)
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	Comparação de enzima imobilizada em alginato de sódio, quitosana e gelatina	Rendimento máximo de GOS 31.2% em reator com 60% de concentração de lactose	Maiores rendimentos foram alcançados com gelatina	Chen <i>et al.</i> (2001)
Adaptado de MACFARLANE <i>et al.</i> (2007)				



Além de estudos realizados sob imobilização da enzima, diversos trabalhos avaliam a produção desse ingrediente, utilizando distintas linhagens, assim como processos diferenciados. Alterações no pH, tempo e temperatura de reação, concentração de lactose, dentre outros, podem alterar significativamente a produção de GOS. Além disso, têm sido demonstrado que a quantidade de GOS produzida a partir de lactose depende também da concentração de  $\beta$ -galactosidase (MACFARLANE *et al.*, 2007).

ONISHI e TANAKA (1995) obtiveram 78mg/mL de GOS a partir de 25% de lactose e após 24 horas de reação utilizando  $\beta$ -galactosidase de *Sterigmatomyces elviae*. Em 1997, estes mesmos autores produziram 72 mg/mL de GOS após incubação de  $\beta$ -galactosidase de *Strobosidium magnum* com 20% de lactose por 24 horas. SHIN e colaboradores (1998) produziram 160 mg/mL de GOS utilizando  $\beta$ -galactosidase de *Bullera singularis*.

ROY e colaboradores (2002) estudaram a produção de GOS com  $\beta$ -galactosidase de *Bifidobacterium infantis* utilizando as variáveis: concentração de células, concentração de lactose, tempo de reação e temperatura. Os valores ótimos encontrados estavam associados com 40% (p/v) de lactose,  $2.106 \text{ ufc/mL}$ ,  $50^\circ\text{C}$  e 6 horas de reação, obtendo 16% de galactooligossacarídeos. O valor de 40% de lactose foi a maior concentração utilizada pelos autores, confirmando a tendencia de que quanto mais lactose houver no meio, mais GOS serão sintetizados (BURVAL *et al.*, 1996, LÓPEZ-LEIVA e GUZMAN, 1995, ALBAYRAK e YANG, 2002).

### 3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRANS, S.A.; GRIFFIN, I.J.; HAWTHORNE, K.M. A combination of prebiotic short- and long-chain inulin-type fructans enhances calcium absorption and bone mineralization in young adolescents. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.82, p. 471-476, 2005.

ALBAYRAK, N.; YANG, S.T. Production of galactooligosaccharides from lactose by *Aspergillus oryzae* beta-galactosidase immobilized on cotton cloth. **Biotechnology and Bioengineering**, v.77, n.1, p.8-19, 2002.

ANGUS, F.; SMART, S.; SHORTT, C. Prebiotic ingredients with emphasis on galacto-oligosaccharides and fructooligosaccharides. In Probiotic Dairy Products. Ed. Tamine, A. p.120–137. Oxford: Blackwell Publishing, 2005.

BECERRA, M.; BAROLI, B.; FADDA, A. M.; BLANCO MÉNDEZ, J.; GONZÁLEZ SISO, M.I. Lactose bioconversion by calcium-alginate immobilization of *Kluyveromyces lactis* cells. **Enzyme and Microbial Technology**, v.29, p.506-512, 2001.

BIELECKA, M.; BIEDRZYCKA, E.; MAJKOWSKA, A. Selection of probiotics and prebiotics for synbiotics and confirmation of their in vivo effectiveness. **Food Res. Int.**, Amsterdam, v.35, n.2/3, p.125-131, 2002.

BIELEKA, M.; BIEDRZYCKA, E.; MAJKOWSKA, A.; JUSKIEWICZ, J.; WROBLEWSKA, M. Effect of non-digestive oligosaccharides on gut microecosystem in rats. **Food Research of the Polish Academy of Sciences**. Division of Food Science, ul. Tuwima, v.10, p.10-747, 2001.

BLANCH, H.W & CLARK, D.S Principles of catalysis In: Biochemical Engineering. New York. Editora Marcel Dekker. 1997.

- BOSSCHER, J.; VAN, L.; FRANK, A. Inulin and oligofructose as prebiotics in the prevention of intestinal infections and diseases. **Nutrition Research Reviews**, v.19, p.216-226, 2006.
- BOUHNİK, Y.; RASKINE, L.; SIMONEAU, G.; VICAUT, E.; NEUT, C.; FLOURIE, B.; BROUNS, F.; BORNET, F.R. The capacity of nondigestible carbohydrates to stimulate fecal bifidobacteria in healthy humans: a double-blind, randomized, placebo-controlled, parallel-group, dose-response relation study. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.80, p.1658–1664, 2004.
- BRUZZESE, E.; VOLPICELLI, M.; SQUAGLIA, M.; TARTAGLIONE, A.; GUARINO, A. Impact of prebiotics on human health. **Digestive and Liver Disease**, v.38, n.2, 2006.
- BURVALL, A.; ASP, N.G.; DAHLQVIST, A. Oligosaccharide formation during hydrolysis of lactose with *Saccharomyces lactislactase* (Maxilat) – Part 1. **Food Chemistry**, v. 7, n. 11, p. 353-361, 1996.
- CHEN, S.; WEI, D.; HU, Z. Synthesis of galacto-oligo-saccharides by immobilized *Bacillus stearothermophilus*. **Wei Sheng Wu Xue Bao**, v.41, p.357–362, 2001.
- CRITTENDEN, R.G.; PLAYNE, M.J.; Production on properties and applications of food-grade oligosaccharides. **Trends in Food Science and Technology**, v.7, n.11, p.353-361, 1996.
- DELZZENE, N. M. Oligosaccharides: State of the art proceedings. **Nutrition Society**, v.62, p.177-182, 2003.
- DEPEINT, F.; TZORTZIS, G.; VULEVIC, J.; I'ANSON, K.; GIBSON, G.R. Prebiotic evaluation of a novel galactooligosaccharide mixture produced by

- the enzymatic activity of *Bifidobacterium bifidum* NCIMB 41171, in healthy humans: a randomized, double-blind, crossover, placebo-controlled intervention study. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.87, p.785-791, 2008.
- FIORDALISO, M., KOK, N., DESAGER, J.P., GOETHALS, F., DEBOYSER, D., ROBERFROID, M.; DELZENNE, N. Dietary oligofructose lowers triglycerides, phospholipids and cholesterol in serum and very low density lipoproteins of rats. **Lipids**, v.30, p.63–167, 1995.
- GEKAS, V.; LOPEZ-LEIVA, M. Hidrolysis of lactose: A Literature Review. **Process Biochemistry**, v.20, p.2-12, 1985.
- GIBSON, G.R. Prebiotics as gut microflora management tools. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v.42, n.2, p.S75-S79, 2008.
- GIBSON, G.R.; ROBERFROID, M.B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. **Journal of Nutrition**, v.125, p.1401–1412, 1995.
- GIBSON, G.R., RASTALL, R.A. AND ROBERFROID, M.B. Prebiotics. In Colonic Microbiota, Nutrition and Health, Ed. Gibson, G.R. and Roberfroid, M.B. p.101–124. Doordrecht: Kluwer Academic Press, 1999.
- GUARNER, F. Inulin and oligofructose: impact on intestinal disease and disorders. **Brazilian Journal of Nutrition**, v.93, p.S61–S65, 2005.
- GULEWICS, P; CIESIOLKAM, D.; FRIAS, J.; VIDAL-VALVERDE, C.; FREJNAGEL, S.; TROJANOWSKA, K.; GULEWICZ, K. Simple method of isolation and purification of alfa-galactosidases from legumes. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v.48, p.3120-3123, 2003.



- HAULY, M.C.O.; MOSCATO, J.A. Inulina e oligofrutose: Uma revisão sobre as propriedades funcionais, efeitos prebióticos e importância na indústria de alimentos. Apresentado na Semana de Ciências Exatas e Tecnológicas, Londrina, v.23, n.1, p.105-118, 2002.
- HARTEMINK, R. Non-digestibleoligosaccharides: healthy food for the colon? Proceedings of the International Symposium “Non-digestible oligosaccharides: healthy food for the colon?”, Holanda – Netherlands, 1997.
- HOLSINGER, V.H. Physical and chemical properties of lactose. In: Lactose, water, salts and vitamins, London, Advanced Dairy Chemistry, v.3, p.1-38, 1997.
- KAUR, N.; GUPTA, A.K. Applications of inulin and oligofructose in health and nutrition. **Journal of Bioscience**, Bangalore, v.27, p.703-714, 2002.
- LEMONS, A. C. G. **Efeito da suplementação de frutooligossacarídeos sobre o sistema imunológico: estudo em ratos**. Campinas, 2008. 78p. Tese de Mestrado, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- LÓPEZ-LEIVA, M.; GUZMAN, M. Formation of oligosaccharides during enzymatic hydrolysis of milk whey permeates. **Process Biochemistry**, v.30, n.8, p.757-762, 1995.
- MACFARLANE, G.T.; STEED H.; MACFARLANE, S. Bacterial metabolism and health-related effects of galacto-oligosaccharides and other prebiotics. **Journal of Applied Microbiology**, v.104, n.2, p.305-344, 2007.

MACFARLANE, S.; MACFARLANE, G.T. Food and the large intestine. In Gut Flora, Nutrition, Immunity and Health, Ed. Fuller, R. and Perdigon, G., p.24–51. Oxford: Blackwell Publishing, 2003.

MACFARLANE, S.; MACFARLANE, G.T.; CUMMINGS, J.H. Prebiotics in the gastrointestinal tract. **Aliment Pharmacol Ther**, v.24, p.701–714, 2006.

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

MELTON, L.J.; BRYANT, S.C.; WAHNER, H.W.; O'FALLON, W.M., MALKASIAN, G.D.; JUDD, H.L.; RIGGS, B.L. Influence of breast feeding and other reproductive factors on bone mass later in life. **Osteoporosis International**, v.3, p.76–83, 1993.

MIZOTA, T. Functional and nutritional foods containing bifidogenic factors. **Bolletín of the International Dairy Federation**, v.313, p.31-35, 1996.

MORAES, F. P.; COLLA, L. M. Functional foods and nutraceuticals: definition, legislation and health benefits. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v.3, n.2, p.99-112, 2006.

MORAIS, M. B. de; JACOB, C. M. A. O papel dos probióticos e prebióticos na prática pediátrica. **Jornal de Pediatria**. (Rio J.), v.82, p.S189-S197, 2006.

MUSSATTO, S. I.; MANCILHA, I. M. Non-digestible oligosaccharides: A Review. **Clinical Microbiology Reviews**. v.68, n.3, p.587-597, 2007.

NAKANO, H. Recente japanese development in the enzymatic production and application oligosaccharides. Apresentado no Seminar on enzyme and bacterial techonolgy, 1998. Campinas, Japon International Cooperation Agency (s.d.), 2007.

- NAKAKUKI, T. Present status and future of functional oligosaccharide development in Japan. **Pure and Applied Chemistry**, v.74, n.7, p.1245-1251, 2002.
- NAKAMURA, Y.; NOSAKA, S.; SUZUKI, M.; NAGAFUCHI, S.; TAKAHASHI, T.; YAJIMA, T.; TAKENOUCHI-OHKUBO, N.; IWASE, T.; MORO, I. Dietary fructooligosaccharides up-regulate immunoglobulin A response and polymeric immunoglobulin receptor expression in intestines of infant mice. **Clin. Exp. Immunol.**, v.137, p.52-58, 2004.
- NAKKHARAT, P.; HALTRICH, D. Lactose hydrolysis and formation of galactooligosaccharides by a novel immobilized beta-galactosidase from the thermophilic fungus *Talaromyces thermophilus*. **Applied Biochemical Biotechnology**, v.129, p.132–215, 2006.
- NEUMANN, A. I. C. P.; ABREU, E. S.; TORRES, E. A. F. S. Alimentos saudáveis, alimentos funcionais, fármaco-alimentos, nutracêuticos... Você ouviu falar neles? **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.14, n.71, p.19-23, 2000.
- ONISHI, N.; TANAKA, T. Purification and properties of a novel thermostable galacto-oligosaccharide producing  $\beta$ -galactosidases from *Sterigmatomyces elviae* CB8119. **Applied and Environmental Microbiology**, v.61, p.4026-4030, 1995.
- ONISHI, N.; TANAKA, T. Purification and characterization of galacto-oligosaccharide producing  $\beta$ -galactosidase from *Sirobasidium magnum*. **Letters in Applied Microbiology**, v.24, p.82-86, 1997.
- ORTUÑO, M.A.; URBÁN, C.; CERÓN, J.; TECLES, F.; ALLENDE, A.; BARBERÁN, F.A.T.; ESPÍN, J.C. Effect of low inulin doses with different polymerisation degree on lipid metabolism, mineral absorption, and

- intestinal microbiota in rats with fat-supplemented diet. **Food Chemistry**, v.113, p.1058-1065, 2009.
- PINEIRO, M.; ASP, N.G.; REID, G.; MACFARLANE, S.; MORELLI, L.; BRUNSER, O.; TUOHY, K. FAO Technical Meeting on Prebiotics. **Journal Clinical Gastroenterology**, v.42, n.3, p.S155-S159, 2008.
- PRENOSIL, J.E., STUKER, E.; BOURNE, J.R. Formation of oligosaccharides during enzymic lactose hydrolysis. I. State of the art. **Biotechnology and Bioengineering**, v.30, p.1019–1025, 1987.
- RAULT-NANIA, M. H., GUEUX, E., DEMOUGEOT, C., DEMIGNE, C., ROCK, E.; MAZUR, A. Inulin attenuates athero-sclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. **Brazilian Journal of Nutrition**, v.96, p.840–844, 2006.
- ROBERFROID, M. B. Functional food concept and its application to prebiotics. **Dig. Liver Dis.**, Rome, v.34, n.2, p.S105-S110, 2002.
- ROBERFROID, M. B. Prebiotics: The Concept Revised. **The Journal of Nutrition**, v.137, n.3, Health Module, p.830S, 2007.
- 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, n.5, p.281-285, 2002.
- SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.42, p.1-16, 2006
- SAKO, T.; MATSUMOTO, K.; TANAKA, R. Recent progress on research and applications on non-digestible galacto-oligosaccharides. **International Dairy Journal**, v.9, p.69-80, 1999.

SANDERS, M.E. Overview of functional foods: emphasis on probiotic bacteria. **Int. Dairy J.**, Amsterdam, v.8, p.341-347, 1998.

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

SILK, D.B.; DAVIS, A.J.; VULEVIC, J.; GIBSON, G.; TZORTZIS, G. Effect of a novel trans-galactooligosaccharide prebiotic on faecal microbiota and symptoms in patients with irritable bowel syndrome. **Gastroenterology**, v.134, n.4, p.A-49, 2008.

SILVA, L. P.; NÖRNBERG, J. L. Prebióticos na nutrição de não ruminantes. **Ciência Rural**, v.33, n.5, 2003.

SNELLING, A., CRESPO, C., SCHAEFFER, M., SMITH, S., WALBOURN, L. Modifiable and nonmodifiable factors associated with osteoporosis in postmenopausal women: results from the Third National Health and Nutrition, 2001.

SPLECHTNA, B., NQUVEN, T.H., STEINBOCK, M., KULBE, K.D., LOR-ENZ, W., HALTRICH, D. Production of prebiotic galacto-oligosaccharides from lactose using beta-galactosidases from *Lactobacillus reuteri*. **Journal of Agricultural Chemistry**, v.54, p.4999–5006, 2006.

SWENNEN, K.; COURTIN, C. M.; DELCOUR, J. A. Non-digestible oligosaccharides with prebiotic properties. **Food Science and Nutrition**, v.46, p.474-459, 2006.

TUOHY, K. M.; ROUZAUD, G. C. M.; BRÜCK, W. M.; GIBSON, G. R. Modulation of human gut microflora towards improved health using prebiotics. **Assessment of Efficacy Current Pharmaceutical Design**, v.11, p.75-90, 2005.

WOLLOWSKI, L.; RECHKEMMER, G.; POOL-ZOBEL, B.L. Protective role of probiotics and prebiotics in colon cancer. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v.73, n.2, p.451-455, 2001.

YUN, J.W. Fructooligosaccharides: Occurrence, preparation and application. **Enzyme and Microbial Technological**, v.19, n.2, p.107-117, 1996.

ZIEMER, C.J.; GIBSON, G.R. An overview of probiotics, prebiotics and symbiotics in the functional food concept: Perspectives and future strategies. **International Dairy Journal**, v.8, n.5-6, p.473-479, 1998.

## **CAPÍTULO 2:**

### **SELEÇÃO DE FUNGOS PRODUTORES DA ENZIMA $\beta$ -GALACTOSIDASE PARA PRODUÇÃO DE GALACTOOLIGOSSACARÍDEOS**





## SELEÇÃO DE FUNGOS PRODUTORES DA ENZIMA $\beta$ -GALACTOSIDASE PARA PRODUÇÃO DE GALACTOOLIGOSSACARÍDEOS

Rodrigues, Daniele; Pastore, Gláucia Maria

Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, CEP 13083-862 – Campinas-SP.

### RESUMO

Os galactooligossacarídeos são ingredientes funcionais com propriedades prebióticas, produzidos através da reação de transgalactosilação enzimática catalisada pela  $\beta$ -galactosidase. Atualmente, o uso crescente de oligossacarídeos nas indústrias de alimentos tem estimulado pesquisas visando a procura de novos microrganismos para a produção desses ingredientes. Este trabalho teve como objetivo a produção da enzima  $\beta$ -galactosidase por linhagens fúngicas para produção de galactooligossacarídeos. Os microrganismos foram selecionados aleatoriamente da coleção de microrganismos do Laboratório de Bioaromas (Departamento de Ciência de Alimentos – UNICAMP) e isolados de amostras de favo de mel coletadas na cidade de Itapira-SP. Foi utilizado farelo de trigo como substrato para a fermentação e produção da enzima. O primeiro passo para selecionar as linhagens de interesse foi verificar a produção da enzima  $\beta$ -galactosidase pelos microrganismos selecionados. Para isso, utilizou-se o composto ONPG (o-nitrofenil  $\beta$ -D-galactopiranosídeo) que, na presença da enzima  $\beta$ -galactosidase, sofre hidrólise e libera o produto o-nitrofenol. A segunda seleção foi a determinação da produção de galactooligossacarídeos através da reação de transgalactosilação da lactose pela enzima  $\beta$ -galactosidase. O estudo resultou em 5 linhagens produtoras de galactooligossacarídeos, que foram identificadas através das análises morfológicas: *Aspergillus sp* (LB-01), *Aspergillus sp* (LB-32), *Aspergillus sp* (LB-36), *Penicillium sp* (LB-51) e *Scopulariopsis sp* (LB-35). O microrganismo com maior produção de 4'galactosil-lactose foi o *Aspergillus sp* (LB-32) que converteu 19,17% da lactose presente no meio e produziu 7,25% do tetrassacarídeo. O segundo maior produtor foi *Penicillium sp* (LB-51) com produção de 6,71%, seguido por *Scopulariopsis sp* (LB-35) com 6,65%, *Aspergillus sp* (LB-01) com 5,22% e *Aspergillus sp* (LB-36) com 4,97% de produção de galactooligossacarídeo.

Termos de indexação: Seleção, galactooligossacarídeos,  $\beta$ -galactosidase, *Aspergillus sp*, *Penicillium sp*, *Scopulariopsis sp*.

### ABSTRACT

Galactooligosaccharide are functional food ingredients with prebiotic properties, produced through the transgalactosylation reaction catalyzed by  $\beta$ -galactosidase enzyme. Actually, the increasing use of oligosaccharides in the food industry has led to the search for new microorganisms for the production of

these ingredients. The aim of this work was the production of  $\beta$ -galactosidase enzyme by fungus strains to produce galactooligosaccharides. The microorganisms were randomly removed from the microorganisms collection of Bioaromas Laboratory (Food Science Department – UNICAMP) and isolated from honeycomb collected at Itapira-SP. Wheat bran was used as substrate to fermentation and enzyme production. The first step to select the interested strains was to check the production of  $\beta$ -galactosidase enzyme by the selected microorganisms. The enzyme production was checked with the use of ONPG (o-nitrophenil  $\beta$ -D-galactopiranosídeo) that, in the presence of  $\beta$ -galactosidase enzyme, it suffers hydrolysis and loose the product o-nitrofenol. The second selection was to determine the galactooligosaccharide production through the transgalactosylation reaction of lactose by  $\beta$ -galactosidase enzyme. The study resulted in 5 galactooligosaccharides producer strains, that were identified by morphological analysis: *Aspergillus sp* (LB-01), *Aspergillus sp* (LB-32), *Aspergillus sp* (LB-36), *Penicillium sp* (LB-51) and *Scopulariopsis sp* (LB-35). The largest producer of 4'-galactosil-lactose was *Aspergillus sp* (LB-32), that has converted 19,17% of lactose actual midst and has produced 7,25% of the tetrasaccharide. The second best producer was *Penicillium sp* (LB-51) with 6,71% of production, followed by *Scopulariopsis sp* (LB-35) with 6,65%, *Aspergillus sp* (LB-01) with 5,22% and *Aspergillus sp* (LB-36) with 4,97% of galactooligosaccharides production.

Key words: Screening, galactooligosaccharides,  $\beta$ -galactosidase, *Aspergillus sp*, *Penicillium sp*, *Scopulariopsis sp*.

## 1. INTRODUÇÃO

Os galactooligosacarídeos são compostos por moléculas de galactose ligadas à lactose, sendo formados de tri a hexassacarídeos com 2 a 5 unidades de galactose (SAKO *et al.*, 1999). São produzidos através da reação de transgalactosilação catalizada pela enzima  $\beta$ -galactosidase, produzindo oligômeros de cadeias com diferentes graus de polimerização (PRENOSIL *et al.*, 1987). Atualmente é um dos ingredientes alimentares mais utilizados nas indústrias devido suas características físico-químicas, que proporcionam uma melhora nas características sensoriais dos alimentos, e principalmente devido suas características fisiológicas. São classificados como prebióticos devido aos efeitos benéficos na proliferação das bifidobactérias no cólon humano e redução das bactérias deterioradoras (NAKANO, 2007). A ingestão de galactooligosacarídeos também aumenta a mineralização óssea e a

resistência contra fraturas devido a estimulação da absorção de cálcio (BROUNS e VERMEER, 2000). São usados na fabricação de gomas de mascar, confeitos, iogurtes e bebidas como açúcares de baixa cariogenicidade, pois não são metabolizados pela microflora bucal para formar ácidos e poliglucanas.

O uso crescente de oligossacarídeos prebióticos nas indústrias de alimentos tem estimulado pesquisas visando a procura de novos microrganismos para a produção desses ingredientes (MORAES e COLLA, 2006). Os trabalhos relatados na literatura compreendem uma grande diversidade de microrganismos produtores de galactooligossacarídeos utilizando condições diferenciadas.

Este trabalho teve como objetivo selecionar novas linhagens fúngicas produtoras da enzima  $\beta$ -galactosidase para a produção de galactooligossacarídeos.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1. Coleta do material e isolamento dos microrganismos**

Os microrganismos utilizados neste trabalho foram selecionados aleatoriamente da coleção de microrganismos do Laboratório de Bioaromas (Departamento de Ciência de Alimentos – UNICAMP) e isolados de amostras de favo de mel coletadas no Apiário Baldoni da cidade de Itapira – SP.

Os microrganismos retirados da coleção foram mantidos em meio PDA (Potato Dextrose Agar) e estocadas sob refrigeração a 15 °C.

As amostras de favo de mel foram inoculadas em erlenmeyers de 250 mL contendo 20 mL de meio YM (Yeast Malt) líquido, previamente esterilizados a 121 °C por 15 minutos, e incubadas em shaker com agitação de 150 rpm numa temperatura de 30 °C durante 48 horas. Em seguida, as culturas foram plaqueadas em meio YM sólido através da técnica de esgotamento e incubadas em estufa com temperatura de 30 °C até o crescimento visível das colônias. As colônias isoladas foram transferidas para tubos contendo meio

PDA e estocadas sob refrigeração à 15 °C.

## 2.2. Produção do extrato enzimático bruto liofilizado

### 2.2.1. Preparação do inóculo

Os microrganismos foram semeados em tubos contendo o meio PDA e incubados em estufa a uma temperatura de 30 °C por 7 dias. Em seguida, foi adicionado 10 mL de água destilada estéril para cada microrganismo e feita a raspagem com alça de platina para a liberação dos esporos, obtendo-se assim suspensões microbianas de concentração celular igual a  $10^8$  esporos/mL (ALMEIDA, 2003).

### 2.2.2. Fermentação

A fermentação foi realizada em meio semi-sólido composto por farelo de trigo e água na proporção 1:1 (p/v). Foram utilizados erlenmeyers de 500 mL contendo 20 g de meio previamente esterilizados a 121 °C por 15 minutos. Adicionou-se 1,0 mL de suspensão microbiana (item 2.2.1) em cada erlenmeyer, sendo em seguida incubados em estufa com temperatura de 30 °C durante 7 dias (ALMEIDA, 2003).

### 2.2.3. Extração enzimática

Após os 7 dias de incubação, foi adicionado 100 mL de água destilada em cada erlenmeyer e os meios foram triturados com bastão de vidro para a liberação das enzimas. As misturas ficaram em repouso durante 1 hora e, em seguida, foram filtradas com gaze. Aos sobrenadantes, foi adicionado etanol resfriado a 8 °C até a concentração de 70% para que ocorresse a precipitação enzimática. Após 1 hora de repouso em banho de gelo, os extratos enzimáticos brutos foram centrifugados a 10000 rpm com temperatura de 4 °C por 10 minutos e os precipitados foram liofilizados. Os extratos enzimáticos brutos liofilizados foram guardados no congelador a -15 °C para posterior análise (ALMEIDA, 2003).

### 2.3. Primeira seleção: Determinação da atividade de $\beta$ -galactosidase

A determinação da atividade dos extratos enzimáticos brutos liofilizados foi realizada segundo SANTOS (2006), utilizando o substrato sintético ONPG (o-nitrofenil  $\beta$ -D-galactopiranosídeo). O meio de reação foi composto por 1,55 mL de tampão acetato de sódio 0,1 M e pH 5,0 contendo o substrato ONPG na concentração 0,25% e 0,15 mL do extrato enzimático bruto liofilizado na concentração 1,0 mg/mL, sendo a mistura incubada em banho com temperatura de 60 °C durante 15 minutos. A reação foi paralisada com 0,15 mL de carbonato de sódio na concentração 10%. O produto da reação é o cromóforo o-nitrofenol, cuja coloração é amarela e pode ser medido no espectrofotômetro em absorbância 420 nm. A calibração do equipamento foi feita através da amostra branco, composta pelos mesmos componentes da reação, porém a solução enzimática foi colocada ao mesmo tempo que o carbonato de sódio 10%, para que a reação fosse paralisada no tempo zero. A atividade enzimática foi calculada através de uma curva padrão de o-nitrofenol. Uma unidade de atividade de  $\beta$ -galactosidase foi definida como a quantidade de enzima que libera 1  $\mu$ mol de o-nitrofenol por minuto de reação.

### 2.4. Segunda seleção: Determinação da produção de galactooligossacarídeos

#### 2.4.1. Produção de galactooligossacarídeos

O sistema de reação para a síntese de galactooligossacarídeos foi composto pela mistura do extrato enzimático bruto liofilizado na concentração 1,0 mg/mL em tampão acetato de sódio 0,1 M e pH 5,0 contendo 40% de lactose. Foram utilizados erlenmeyers de 50 mL contendo 10 mL de tampão acetato de sódio 0,1 M e pH 5,0, 10 mg do extrato enzimático bruto liofilizado e 4 g de lactose. Os erlenmeyers foram incubados durante 24 horas em banho com temperatura de 45 °C e agitação de 100 rpm. A reação foi paralisada pela inativação da enzima em banho fervente a 100 °C durante 10 minutos e as amostras foram analisadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (SANTOS, 2006).

#### 5.4.2. Análise dos galactooligossacarídeos

Os produtos da reação foram analisados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e detectados por índice de refração. Foi utilizado um Cromatógrafo Líquido Waters com coluna KS-801 (300 x 7,8 µm) e, como fase móvel, foi utilizada água ultra pura a um fluxo de 1 mL/minuto e temperatura de 80 °C. Os carboidratos foram identificados através da comparação com o tempo de retenção dos padrões lactose, glicose, galactose e 4'galactosil-lactose (tetrassacarídeo). A quantificação foi realizada segundo JUNG e LEE (2008) através da análise das áreas da lactose obtidas no tempo zero e depois de 24 horas de reação, e da área do galactooligossacarídeo formado no final da reação.

$$\text{Conversão da lactose} = \frac{\text{Concentração inicial da lactose} - \text{Concentração final da lactose}}{\text{Concentração inicial da lactose}} \times 100$$

$$\text{Produção de GOS} = \frac{\text{Concentração de oligossacarídeos}}{\text{Concentração inicial da lactose}} \times 100$$

Os microrganismos com maior capacidade de transgalactosilação e produção de galactooligossacarídeos foram identificados de acordo com as características macro e microscópicas, sendo esta última através da técnica de microcultivo, onde os microrganismos foram semeados em lâminas contendo o meio PDA e corados com o corante Azul de Lactofenol, sendo em seguida analisados no microscópio óptico comum Nikon através da lente objetiva com um aumento de 100x (<http://www.science.ulst.ac.uk/rm/Techniques.html>).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. Seleção dos microrganismos

O procedimento de seleção dos microrganismos resultou em 38 fungos filamentosos isolados de favo de mel (Itapira-SP) e 40 retirados aleatoriamente

da coleção de culturas microbianas do Laboratório de Bioaromas (Departamento de Ciência de Alimentos - UNICAMP), totalizando 78 linhagens fúngicas.

A utilização de farelo de trigo como substrato para crescimento dos microrganismos foi bastante satisfatória. Estudos na literatura relatam a produção da enzima  $\beta$ -galactosidase através da utilização do farelo de trigo como substrato para a fermentação (SANTOS, 2006; ALMEIDA, 2003).

### 3.2. Primeira seleção: Determinação da atividade enzimática

O primeiro passo para selecionar as linhagens de interesse foi verificar a produção da enzima  $\beta$ -galactosidase pelos microrganismos selecionados. A maioria das  $\beta$ -galactosidases são sintetizadas intracelularmente por microrganismos que utilizam o açúcar para produzir energia durante a fermentação (BECERRA *et al.*, 2001). A maneira mais relatada na literatura para determinar a atividade dessa enzima é através da utilização do substrato sintético ONPG (o-nitrofenil  $\beta$ -D-galactopiranosídeo) (GOULAS *et al.*, 2007; GUVEN *et al.*, 2007; LI *et al.*, 2009).

De acordo com BLANCH e CLARK (1997), as  $\beta$ -galactosidases atuam como catalisador biológico da reação que hidrolisa ligações  $\beta$ -galactosil em glicoproteínas, polissacarídeos, dissacarídeos, e compostos tais como orto e para-nitrofenil- $\beta$ -D-galactosídeos, sendo esse dois últimos usados para determinar a atividade de  $\beta$ -galactosidase.

Após a reação dos extratos enzimáticos brutos liofilizados com o substrato ONPG, cerca de 24% das linhagens mostraram atividade de hidrólise liberando o produto o-nitrofenol, que foi medido no espectrofotômetro em absorbância a 420 nm, comprovando a produção da enzima desejada. Dessas linhagens, 5 cepas se destacaram por possuir os maiores valores de atividade enzimática (Tabela 2.1), sendo selecionadas para o teste de produção de galactooligossacarídeos.

A atividade das enzimas foi calculada através de uma curva padrão de o-nitrofenol. Uma unidade de atividade de  $\beta$ -galactosidase (U) foi definida como

a quantidade de enzima que libera 1  $\mu\text{mol}$  de o-nitrofenol por minuto de reação.

Tabela 2.1 – Microrganismos com maiores valores de atividade enzimática.

Microrganismos	Fonte	Atividade Enzimática
<i>Aspergillus sp</i> (LB-01)	Favo de mel	58 U
<i>Aspergillus sp</i> (LB-32)	Coleção	104 U
<i>Aspergillus sp</i> (LB-36)	Coleção	55 U
<i>Penicillium sp</i> (LB-51)	Coleção	67 U
<i>Scopulariopsis sp</i> (LB-35)	Coleção	63 U

### 3.3. Segunda seleção: Determinação da produção de galactooligossacarídeos

Após os microrganismos serem analisados quanto à produção da enzima  $\beta$ -galactosidase, eles foram testados para a produção de galactooligossacarídeos. O meio de reação foi composto por 40% de lactose e 1,0 mg/mL do extrato enzimático bruto liofilizado em tampão acetato de sódio com pH 5,0. Após 24 horas de reação em temperatura a 60 °C, pôde-se observar, através da análise cromatográfica, que as 5 linhagens selecionadas produziram o tetrassacarídeo 4'galactosil-lactose. O microrganismo com maior produção foi o *Aspergillus sp* (LB-32), que converteu 19,17% da lactose e produziu 7,25% de galactooligossacarídeo (Figura 2.1).

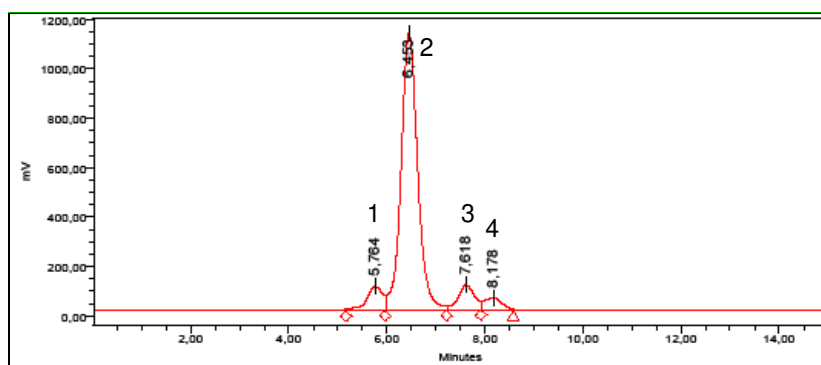


Figura 2.1 – Cromatograma obtido pela linhagem *Aspergillus sp* (LB-32).  
 Legenda: 1 – pico referente à 4'galactosil-lactose; 2 – pico referente à lactose;  
 3 – pico referente à glicose; 4 – pico referente à galactose.



O segundo maior produtor de 4'galactosil-lactose foi a linhagem *Penicillium sp* (LB-51), produzindo 6,71% de galactooligossacarídeo através da conversão de 17,39% da lactose inicial (Figura 2.2), seguido pelo microrganismo *Scopulariopsis sp* (LB-35), que converteu 16,98% de lactose e produziu 6,65% de galactooligossacarídeo (Figura 2.3).

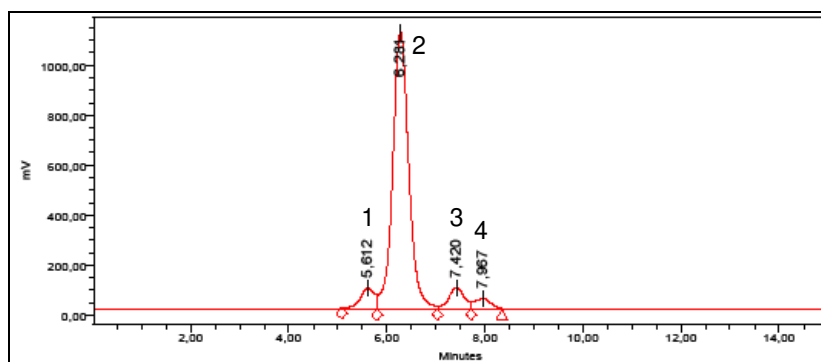


Figura 2.2 – Cromatograma obtido pela linhagem *Penicillium sp* (LB-51).  
 Legenda: 1 – pico referente à 4'galactosil-lactose; 2 – pico referente à lactose;  
 3 – pico referente à glicose; 4 – pico referente à galactose.

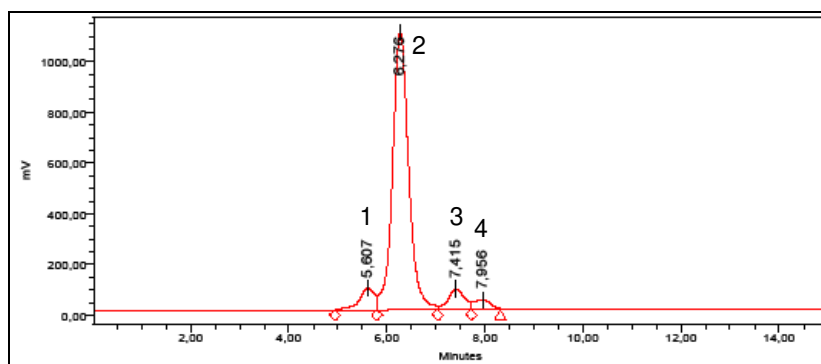


Figura 2.3 – Cromatograma obtido pela linhagem *Scopulariopsis sp* (LB-35).  
 Legenda: 1 – pico referente à 4'galactosil-lactose; 2 – pico referente à lactose;  
 3 – pico referente à glicose; 4 – pico referente à galactose.

Os microrganismos que apresentaram menores atividades de transgalactosilação foram *Aspergillus sp* (LB-01) e *Aspergillus sp* (LB-36), com produções de 5,22% e 4,97% de galactooligossacarídeo através da conversão de 11,48% e 11,56% da lactose inicial presente no meio da reação,

respectivamente (Figuras 2.4 e 2.5).

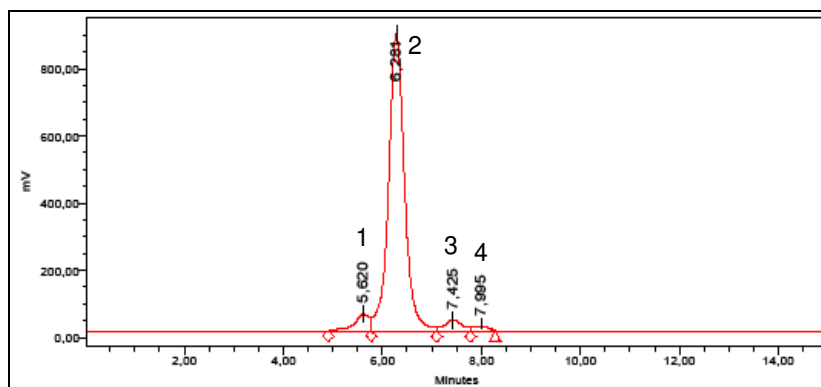


Figura 2.4 – Cromatograma obtido pela linhagem *Aspergillus sp* (LB-01).  
 Legenda: 1 – pico referênte à 4'galactosil-lactose; 2 – pico referente à lactose;  
 3 – pico referente à glicose; 4 – pico referente à galactose.

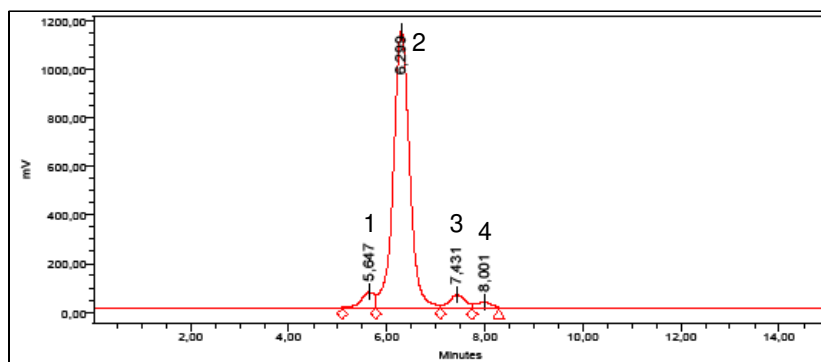


Figura 2.5 – Cromatograma obtido pela linhagem *Aspergillus sp* (LB-36).  
 Legenda: 1 – pico referênte à 4'galactosil-lactose; 2 – pico referente à lactose;  
 3 – pico referente à glicose; 4 – pico referente à galactose.

Atualmente, o uso crescente de oligossacarídeos prebióticos nas indústrias de alimentos tem estimulado pesquisas visando a procura de novos microrganismos para a produção desses ingredientes (MORAES e COLLA, 2006).

Os trabalhos relatados na literatura compreendem uma grande diversidade de microrganismos produtores de galactooligossacarídeos utilizando condições diferenciadas. NERI *et al.* (2008) produziu 26% de

galactooligossacarídeos utilizando a enzima  $\beta$ -galactosidase do microrganismo *Aspergillus oryzae*. MARTÍNEZ-VILLALUENGA *et al.* (2008) utilizaram o microrganismo *Kluyveromyces lactis* para produzir 17% de galactooligossacarídeos. CARDELLE e colaboradores (2008) utilizaram o mesmo microrganismo e, com algumas alterações nas condições da reação, conseguiram aumentar essa produção para 36,8%. Os mesmos autores produziram 19% de galactooligossacarídeos a partir de *Aspergillus aculeatus*. O microrganismo *Talaromyces thermophilus* foi utilizado por NAKKHARAT e HALTRICH em 2006 para a produção de 34% de galactooligossacarídeo.

Comparado com outras pesquisas, os microrganismos em estudo produziram menores concentrações de galactooligossacarídeos. Porém, não podemos afirmar que esses são os valores máximos de produção pois ainda não foram testadas outras condições experimentais. Vale lembrar que os resultados de outros autores aqui apresentados já estão em condições otimizadas do processo.

O microcultivo é uma técnica bastante comum para a identificação de fungos filamentosos e mostrou-se eficiente para a identificação dos gêneros dos microrganismos. Através das análises microscópicas, adicionada às análises macroscópicas das colônias dos microrganismos, ficou evidente que as linhagens utilizadas neste trabalho pertenciam aos gêneros *Aspergillus sp*, *Penicillium sp* e *Scopulariopsis sp*. As Figuras 2.6, 2.7 e 2.8 ilustram as características específicas de cada gênero, obtidas através de fotografias obtidas pelo microscópio óptico comum.



Figura 2.6 – Fotografia ilustrando as características específicas do gênero *Aspergillus sp* obtida através de microscópio óptico comum.

As espécies do gênero *Aspergillus sp* caracterizam-se por apresentar hifas septadas e hialinas. Os conidióforos são simples, com parede celular lisa, originados na célula-pé da porção basal. O conidióforo, em seu ápice dilata-se em uma vesícula de forma globosa, das quais nascem as fiálides.



Figura 2.7 – Fotografia ilustrando as características específicas do gênero *Penicillium sp* obtida através de microscópio óptico comum.

No gênero *Penicillium sp*, as hifas são septadas e hialinas e é comum os conidióforos formarem uma estrutura ramificada semelhante a um pincel que termina em fiálides.



Figura 2.8 – Fotografia ilustrando as características específicas do gênero *Scopulariopsis sp* obtida através de microscópio óptico comum.

A morfologia microscópica do gênero *Scopulariopsis sp* demonstra uma cadeia de fiálides simples agregados produzidos na base do septo por uma células conidiogênica especializada denominada anelídeo.

#### 4. CONCLUSÃO

O trabalho mostrou que existe uma grande quantidade de microrganismos na natureza que podem ser selecionados para diversos usos biotecnológicos.

O substrato farelo de trigo mostrou-se eficiente para o crescimento microbiano, permitindo a produção da enzima  $\beta$ -galactosidase.

A seleção resultou em 5 linhagens produtoras do tetrassacarídeo 4'galactosil-lactose, embora os resultados necessitem de estudos extras para otimizar o processo e aumentar a produção.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, M.M. **Síntese de galactooligossacarídeos por  $\beta$ -Galactosidase de *Scopulariopsis* sp a partir da lactose**. Campinas, 2003. 162p. Tese de Doutorado, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- BECERRA, M.; BAROLI, B.; FADDA, A. M.; BLANCO MÉNDEZ, J.; GONZÁLEZ SISO, M.I. Lactose bioconversion by calcium-alginate immobilization of *Kluyveromyces lactis* cells. **Enzyme and Microbial Technology**, v.29, p.506-512, 2001.
- BLANCH, H.W.; CLARK, D.S. Principles of catalysis In: Biochemical Engineering. New York. Editora Marcel Dekker. 1997.
- BROUNS, F.; VERMEER, C. Functional food ingredients for reducing the risks of osteoporosis. **Trends in Food Science & Technology**. v. 11, p. 22-33, 2000.
- CARDELLE-COBAS, A.; MARTÍNEZ-VILLALUENGA, C.; SANZ, M. L.; MONTILLA, A. Gas chromatographic–mass spectrometric analysis of galactosyl derivatives. **Food Chemistry**, In Press, 2008.
- GOULAS, A.; TZORTZIS, G.; GIBSON, G. R. Development of a process for the production and purification of a- and b-galactooligosaccharides from *Bifidobacterium bifidum* NCIMB 41171. **International Dairy Journal**, v.17, p.648-656, 2007.
- GUVEN, R. G.; GUVEN, K.; POLI, A.; NICOLAUS, B. Purification and some properties of a b-galactosidase from the thermoacidophilic *Alicyclobacillus acidocaldarius* subsp. *rittmannii* isolated from Antarctica. **Enzyme and Microbial Technology**, v.40, p.1570-1577, 2007.

- JUNG, S.J.; LEE, B.H. Production and application of galactooligosaccharides from lactose by a recombinant  $\beta$ -Galactosidase of *Bifidobacterium infantis* overproduced by *Pichia pastoris*. **Food Science and Biotechnology**, v.17, n.3, p. 514-518, 2008.
- LI, L.; ZHANG, M.; JIANG, Z.; TANG, L.; CONG, Q. Characterisation of a thermostable family 42  $\beta$ -galactosidase from *Thermotoga maritima*. **Food Chemistry**, v.112, p.844-850, 2009.
- MOORE, R. T. Basic Mycological Techniques. Disponível em: <<http://www.science.ulst.ac.uk/rtm/Techniques.html>> Acessado em: 15/12/2008.
- MORAES, F. P.; COLLA, L. M. Functional foods and nutraceuticals: definition, legislation and health benefits. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v.3, n.2, p.99-112, 2006.
- MARTÍNEZ-VILLALUENGA, C.; CARDELLE-COBAS, A.; CORZO, N.; OLANO, A.; VILLAMIEL, M. Optimization of conditions for galactooligosaccharide synthesis during lactose hydrolysis by  $\beta$ -Galactosidase from *Kluyveromyces lactis* (Lactozym 3000 L HP G). **Food Chemistry**, v.107, p.258-264, 2008.
- NAKANO, H. Recente japanese development in the enzymatic production and application oligosaccharides. Apresentado no Seminar on enzyme and bacterial techonolgy, 1998. Campinas, Japon International Cooperation Agency (s.d.), 2007.
- NAKKHARAT, P.; HALTRICH, D. Lactose hydrolysis and formation of galactooligosaccharides by a novel immobilized beta-galactosidase from the thermophilic fungus *Talaromyces thermophilus*. **Applied Biochemical Biotechnology**, v.129, p.132–215, 2006.

NERI, D.F.M.; BALCÃO, V.M.; COSTA, R.S.; ROCHA, I.C.A.; FERREIRA, E.M.F.; TORRES, D.P.M.; RODRIGUES, L.R.M.; CARVALHO Jr, L.B.; TEIXEIRA, J.A. Galacto-oligosaccharides production during lactose hydrolysis by free *Aspergillus oryzae*  $\beta$ -galactosidase and immobilized on magnetic polysiloxane-polyvinyl alcohol, **Food Chemistry**. In Press, 2008.

PRENOSIL, J.E., STUKER, E.; BOURNE, J.R. Formation of oligosaccharides during enzymic lactose hydrolysis. I. State of the art. **Biotechnology and Bioengineering**, v.30, p.1019–1025, 1987.

SANTOS, R. **Produção de galactooligossacarídeo por lactase fúngica**. Campinas, 2006. 54p. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

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



### **CAPÍTULO 3:**

## **ESTUDO DO PROCESSO FERMENTATIVO PARA PRODUÇÃO DO EXTRATO BRUTO DA ENZIMA $\beta$ -GALACTOSIDASE**



## ESTUDO DO PROCESSO FERMENTATIVO PARA PRODUÇÃO DO EXTRATO BRUTO DA ENZIMA $\beta$ -GALACTOSIDASE

Rodrigues, Daniele; Pastore, Gláucia Maria

Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, CEP 13083-862 – Campinas-SP.

### RESUMO

Atualmente, um dos desenvolvimentos mais significativos na ciência é o de alimentos funcionais, relacionado ao desenvolvimento de suplementos dietéticos que afetam benéficamente a saúde. Dentre esses podemos citar os galactooligossacarídeos, que é um grupo de oligossacarídeos considerados como carboidratos não digeríveis devido sua resistência à hidrólise das enzimas do intestino. Dentre os benefícios da ingestão de galactooligossacarídeos estão o aumento da população de bifidobactérias no cólon e, com isso, a redução dos níveis de bactérias patogênicas, além do aumento da absorção de cálcio e a redução do risco de câncer de cólon. A produção dos galactooligossacarídeos tem sido estudada extensivamente em microrganismos, através da reação de transgalactosilação enzimática catalisada pela  $\beta$ -galactosidase. A produção da enzima  $\beta$ -galactosidase é um processo importante para a produção de galactooligossacarídeos, pois as condições utilizadas durante a fermentação pode interferir na quantidade e atividade da enzima produzida. O principal objetivo desse trabalho foi o estudo do processo fermentativo para a produção do extrato bruto da enzima  $\beta$ -galactosidase utilizando os microrganismos: *Aspergillus sp* (LB-32), *Penicillium sp* (LB-51) e *Scopulariopsis sp* (LB-35). Foi realizado um delineamento experimental, composto por 9 tratamentos, visando avaliar o efeito da temperatura (24, 30 e 36 °C), umidade (40, 50 e 60%) e concentração de lactose (0, 7,5 e 15%) no meio para a produção enzimática. Durante o experimento, pôde-se observar que alguns tratamentos favoreceram o crescimento dos microrganismos, enquanto outros foram desfavoráveis. O tratamento controle T9 (que compreende as condições 30 °C, 0% de concentração de lactose no meio e 50% de umidade) foi o que mais se destacou, possuindo os maiores valores de atividade para todos os microrganismos. Todos os outros tratamentos possuíram valores de atividade enzimática significativamente inferiores ( $P < 0,05$ ) aos valores obtidos no tratamento controle. Dessa forma, conclui-se que o tratamento T9 possui as melhores condições para a produção da enzima  $\beta$ -galactosidase, mesmo não possuindo nenhuma concentração de lactose no meio, tendo em vista que a maioria dos microrganismos relatados na literatura necessita da indução da lactose para a produção enzimática.

Termos de indexação:  $\beta$ -galactosidase, fermentação, *Aspergillus sp*, *Penicillium sp* e *Scopulariopsis sp*.

**ABSTRACT**

Actually, one of the most significant development in science are functional foods, connected with the development of dietetic supplement that affects beneficially the health. Among these, we can mention the galactooligosaccharides, that is a group of oligosaccharides considered as non-digestible carbohydrates due to their resistance to hydrolysis of intestine enzymes. Among the benefits obtained with galactooligosaccharides ingestion are the increase of bifidobacteria population in the colon and, by their antagonistic effect, the reduction of the pathogenic bacteria level, over the increase of calcium absorption and the reduction of colon's cancer risks. The production of galactooligosaccharides has been extensively studied in microorganisms, through the transgalactosylation reaction catalyzed by  $\beta$ -galactosidase enzyme. The production of  $\beta$ -galactosidase enzyme is an important process to galactooligosaccharide production, because the conditions used during fermentation can interfere at the quantity and activity of the produced enzyme. The aim of this work was the study of the fermentation process to produce the brute extract of  $\beta$ -galactosidase enzyme using the microorganisms: *Aspergillus sp* (LB-32), *Penicillium sp* (LB-51) and *Scopulariopsis sp* (LB-35). An experimental design was realized, consisting of 9 treatments, to evaluate the effect of temperature (24, 30 and 36 °C), humidity (40, 50 and 60%) and lactose concentration (0, 7,5 and 15%) in medium to produce the enzyme. During the experiment, it could be noticed that some treatments promoted the growth of the microorganisms, while others were disadvantageous. The control treatment T9 (that consists of 30 °C, 0% of lactose concentration in medium and 50% of humidity) was the best, with the biggest activity values for all microorganisms. The other treatments showed enzymatic activity values significantly poorer ( $p<0,05$ ) than the values obtained in control treatment. Thus, it concludes that the treatment T9 has the best conditions to produce  $\beta$ -galactosidase enzyme, even that it doesn't have any lactose concentration in medium, even by knowing that a big number of microorganisms in literature need lactose induction to produce the enzyme.

Key words:  $\beta$ -galactosidase, fermentation, *Aspergillus sp*, *Penicillium sp* e *Scopulariopsis sp*.

**1. INTRODUÇÃO**

A enzima  $\beta$ -galactosidase é classificada como uma hidrolase, com capacidade de transferase para grupos galactosil, catalisando o resíduo terminal  $\beta$ -galactopiranosil da lactose (Gal $\beta$ 1 – 4Glc) para formar glicose e galactose (BLANCH e CLARK, 1997; HOLSINGER, 1997). Popularmente conhecida como lactase ou formalmente como  $\beta$ -D-

galactosideogalactohidrolase, é uma das enzimas mais estudadas e relatadas na literatura. (GÉKAS e LOPEZ-LEIVA, 1985; HOLSINGER, 1997; MAHONEY, 1997). Com poucas exceções, as  $\beta$ -galactosidases são sintetizadas intracelularmente por microrganismos que utilizam o açúcar para produzir energia durante a fermentação (BECERRA *et al.*, 2001). Durante o processo fermentativo, a formação da  $\beta$ -galactosidase pode ser influenciada por diversos fatores como a temperatura, a umidade e a presença de lactose no meio. As  $\beta$ -galactosidases atuam também como catalisador biológico da reação que hidrolisa ligações  $\beta$ -galactosil em glicoproteínas, polissacarídeos, dissacarídeos, e compostos tais como orto e para-nitrofenil- $\beta$ -D-galactosídeos, sendo esse dois últimos usados para determinar a atividade de  $\beta$ -galactosidase (BLANCH e CLARK, 1997). Segundo PRENOSIL *et al.* (1987), o mecanismo de hidrólise da lactose foi descrito pela primeira vez em 1960 por WALLENFELS e MALHOTRA utilizando lactase produzida por *Escherichia coli*. Os galactooligossacarídeos são produtos da ação da  $\beta$ -galactosidase, que realiza a reação de transgalactosilação da lactose produzindo oligômeros de cadeias de diferentes comprimentos (PRENOSIL *et al.*, 1987). Os galactooligossacarídeos estão entre os ingredientes alimentares mais freqüentemente usados no desenvolvimento de produtos devido suas características físico-químicas e funcionais. São classificados como oligossacarídeos não-digeríveis (NDOs) e, portanto, como prebióticos. Apresentam não só a função nutricional ou de adoçante, mas também exibem atividades fisiológicas, sendo assim denominados ingredientes funcionais (NAKANO, 2007). Dentre os benefícios da ingestão de galactooligossacarídeos estão o aumento da população de bifidobacterias no cólon e, com isso, a redução dos níveis de bactérias patogênicas, além do aumento da absorção de cálcio e a redução do risco de câncer de cólon (ROBERFROID, 2007). A produção da enzima  $\beta$ -galactosidase é um processo importante para a produção de galactooligossacarídeos, pois as condições utilizadas durante a fermentação pode interferir na quantidade e atividade da enzima produzida.

Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da temperatura, umidade e concentração de lactose no processo fermentativo para a produção

do extrato bruto da enzima  $\beta$ -galactosidase, através da utilização dos microrganismos: *Aspergillus sp* (LB-32), *Penicillium sp* (LB-51) e *Scopulariopsis sp* (LB-35).

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. Microrganismos e produção do inóculo

Os microrganismos utilizados neste trabalho foram *Aspergillus sp* (LB-32), *Penicillium sp* (LB-51) e *Scopulariopsis sp* (LB-35), retirados da coleção de microrganismos do Laboratório de Bioaromas (Departamento de Ciência de Alimentos – UNICAMP).

Os microrganismos foram semeados em tubos contendo o meio PDA e incubados em estufa a uma temperatura de 30 °C por 7 dias. Em seguida, foi adicionado 10 mL de água destilada estéril para cada microrganismo e feita a raspagem com alça de platina para a liberação dos esporos, obtendo-se assim suspensões microbianas de concentração celular igual a  $10^8$  esporos/mL (ALMEIDA, 2003).

### 2.2. Fermentação

Para avaliar as condições do processo fermentativo sobre a produção do extrato bruto da enzima  $\beta$ -Galactosidase, foi realizado um delineamento experimental inteiramente casualizado composto por 9 tratamentos (Tabela 3.1) e 3 repetições por tratamento. A análise estatística foi realizada utilizando o software SAS System for Windows (Release 8,02 TS Level 02M0) e as diferenças foram consideradas significativas quando  $P < 0,05$  (ANOVA/teste de Tukey).

Tabela 3.1 – Tratamentos utilizados para o estudo da fermentação.

Tratamentos	Temperatura (°C)	Concentração de Lactose (%)	Umidade (%)
1	24	7,5	40
2	24	7,5	60
3	24	15	40
4	24	15	60
5	36	7,5	40
6	36	7,5	60
7	36	15	40
8	36	15	60
9	30	0	50

Para todos os tratamentos, a fermentação foi realizada em meio semi-sólido composto por farelo de trigo e água utilizando-se diferentes valores de umidade e diferentes concentrações do indutor lactose, de acordo com os tratamentos do delineamento. O tratamento 9 foi utilizado como controle, compreendendo as condições usuais para o crescimento microbiano (30 °C, 0% de concentração de lactose no meio e 50% de umidade). Foram utilizados erlenmeyers de 500 mL contendo 20 g de meio previamente esterilizado a 121 °C por 15 minutos. Adicionou-se 1,0 mL da suspensão microbiana (item 2.1) em cada erlenmeyer, sendo em seguida incubados em estufas com diferentes temperaturas por 7 dias.

### 2.3. Extração enzimática

Após os 7 dias de incubação, foi adicionado 100 mL de água destilada em cada erlenmeyer e os meios foram triturados com bastão de vidro para a liberação das enzimas. As misturas ficaram em repouso durante 1 hora e, em seguida, foram filtradas com gaze. Aos sobrenadantes, foi adicionado etanol

resfriado a 8 °C até a concentração de 70% para que ocorresse a precipitação enzimática. Após 1 hora de repouso em banho de gelo, os extratos enzimáticos brutos foram centrifugados a 10000 rpm com temperatura de 4 °C por 10 minutos e os precipitados foram liofilizados. Os extratos enzimáticos brutos liofilizados foram guardados no congelador a -15 °C para posterior análise (ALMEIDA, 2003).

#### 2.4. Determinação da atividade de $\beta$ -galactosidase

O resultado do delineamento foi a leitura da atividade dos extratos enzimáticos brutos liofilizados, realizada segundo SANTOS (2006) utilizando o substrato sintético ONPG (o-nitrofenil  $\beta$ -D-galactopiranosídeo). O meio de reação foi composto por 1,55 mL de tampão acetato de sódio 0,1 M e pH 5,0 contendo o substrato ONPG na concentração 0,25% e 0,15 mL do extrato enzimático bruto liofilizado na concentração 1,0 mg/mL, sendo a mistura incubada em banho com temperatura de 60 °C durante 15 minutos. A reação foi paralisada com 0,15 mL de carbonato de sódio na concentração 10%. O produto da reação é o cromóforo o-nitrofenol, cuja coloração é amarela e pode ser medido no espectrofotômetro em absorbância 420 nm. A calibração do equipamento foi feita através da amostra branco, composta pelos mesmos componentes da reação, porém a solução enzimática foi colocada ao mesmo tempo que o carbonato de sódio 10%, para que a reação fosse paralisada no tempo zero. A atividade enzimática foi calculada através de uma curva padrão de o-nitrofenol. Uma unidade de atividade de  $\beta$ -galactosidase foi definida como a quantidade de enzima que libera 1  $\mu$ mol de o-nitrofenol por minuto de reação.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para avaliar os efeitos da temperatura, concentração de lactose e umidade no processo fermentativo para a produção do extrato bruto da enzima  $\beta$ -Galactosidase, foi realizado um delineamento experimental inteiramente casualizado composto por 9 tratamentos e 3 repetições por tratamento. A



análise estatística foi realizada utilizando o software SAS System for Windows (Release 8,02 TS Level 02M0) e as diferenças foram consideradas significativas quando  $P < 0,05$  (ANOVA/teste de Tukey).

Os resultados obtidos no estudo da fermentação dos microrganismos *Aspergillus sp* (LB-32), *Penicillium sp* (LB-51) e *Scopulariopsis sp* (LB-35) estão apresentados na Tabela 3.2.

Tabela 3.2 – Valores médios das atividades enzimáticas (em Unidades) obtidas para cada microrganismo utilizado no estudo da fermentação.

Tratamentos	<i>Aspergillus sp</i> (LB-32)	<i>Penicillium sp</i> (LB-51)	<i>Scopulariopsis</i> <i>sp</i> (LB-35)
1	65,3 <sup>b</sup>	14,3 <sup>b</sup>	54,3 <sup>b</sup>
2	26,0 <sup>c</sup>	2,6 <sup>c</sup>	22,0 <sup>c</sup>
3	9,0 <sup>d</sup>	4,0 <sup>c</sup>	5,3 <sup>d</sup>
4	4,6 <sup>d</sup>	11,0 <sup>b</sup>	7,3 <sup>d</sup>
5	1,3 <sup>d</sup>	1,3 <sup>c</sup>	19,3 <sup>c</sup>
6	3,3 <sup>d</sup>	1,6 <sup>c</sup>	2,3 <sup>d</sup>
7	65,0 <sup>b</sup>	1,0 <sup>c</sup>	6,3 <sup>d</sup>
8	7,0 <sup>d</sup>	2,0 <sup>c</sup>	3,6 <sup>d</sup>
9	103,3 <sup>a</sup>	67,3 <sup>a</sup>	63,6 <sup>a</sup>

Letras diferentes na mesma coluna correspondem diferenças significativas ( $P < 0,05$ ). T1 – 24 °C, 7,5% de lactose, 40% de umidade; T2 – 24 °C, 7,5% de lactose, 60% de umidade; T3 – 24 °C, 15% de lactose, 40% de umidade; T4 – 24 °C, 15% de lactose, 60% de umidade; T5 – 36 °C, 7,5% de lactose, 40% de umidade; T6 – 36 °C, 7,5% de lactose, 60% de umidade; T7 – 36 °C, 15% de lactose, 40% de umidade; T8 – 36 °C, 15% de lactose, 60% de umidade; T9 – controle: 30 °C, 0% de lactose, 50% de umidade.

Durante o experimento, pôde-se observar que alguns tratamentos favoreceram o crescimento dos microrganismos, enquanto outros foram desfavoráveis. Os tratamentos T3 (24 °C, 15% de lactose, 40% de umidade), T6 (36 °C, 7,5% de lactose, 60% de umidade) e T8 (36 °C, 15% de lactose,

60% de umidade) foram os que apresentaram os menores valores de atividade enzimática para os 3 microrganismos em estudo.

Embora todos os tratamentos estejam mostrando algum valor para atividade enzimática, o tratamento T9 foi o que mais se destacou, possuindo os maiores valores de atividade para todos os microrganismos. Este foi o tratamento controle, compreendendo as condições usuais para o crescimento microbiano, quais sejam: temperatura de incubação a 30 °C, 0% de concentração de lactose no meio e 50% de umidade (p/v). Todos os outros tratamentos (com temperaturas de 24 e 36 °C; 7,5 e 15% de lactose no meio e 40 e 60% de umidade) possuíram valores de atividade enzimática significativamente inferiores ( $P < 0,05$ ) aos valores obtidos no tratamento controle. Esse resultado sugere que o tratamento 9 possui as melhores condições para a produção da enzima  $\beta$ -galactosidase, mesmo não possuindo nenhuma concentração de lactose no meio. Isso pode ser visto como uma vantagem para baratear ainda mais o processo, juntamente com a utilização do substrato farelo de trigo, que é um subproduto da indústria de alimentos e possui baixo valor agregado. A maioria dos microrganismos relatados na literatura necessita da indução da lactose para a produção da  $\beta$ -galactosidase (ISHIKAWA *et al.*, 2005; HSU *et al.*, 2005, ONISHI e TANAKA, 1995).

O tratamento T1, com temperatura de 24 °C, 7,5% de lactose e 40% de umidade, foi o segundo melhor tratamento para todos os microrganismos.

Analisando os microrganismos separadamente observa-se que, para o *Aspergillus sp* (LB-32), os melhores tratamentos, em ordem decrescente, foram T9 (30 °C, 0% de lactose, 50% de umidade), T1 (24 °C, 7,5% de lactose, 40% de umidade), T7 (36 °C, 15% de lactose, 40% de umidade) e T2 (24 °C, 7,5% de lactose, 60% de umidade).

Para o *Penicillium sp* (LB-51), se destacaram como os melhores tratamentos o T9 (30 °C, 0% de lactose, 50% de umidade), T1 (24 °C, 7,5% de lactose, 40% de umidade) e T4 (24 °C, 15% de lactose, 60% de umidade).

Finalmente, para o *Scopulariopsis sp* (LB-35), os melhores tratamentos foram T9 (30 °C, 0% de lactose, 50% de umidade), T1 (24 °C, 7,5% de lactose, 40% de umidade), T2 (24 °C, 7,5% de lactose, 60% de umidade) e T5 (36 °C,

7,5% de lactose, 40% de umidade).

Diversos trabalhos na literatura tem relatado condições diferenciadas para a produção da enzima  $\beta$ -galactosidase. NAGY *et al.* (2001) obtiveram 0,16 U de atividade enzimática de *Penicillium chrysogenum* através da utilização de um meio contendo 20% de lactose e incubação em temperatura de 65 °C. ALMEIDA (2003) produziu 1,44 U de  $\beta$ -galactosidase utilizando *Scopulariopsis sp.*, que foi cultivado em meio farelo de trigo sem lactose e incubado em temperatura de 30 °C durante 7 dias. Ao aumentar a temperatura de 35 °C para 43 °C, TARI *et al.* (2008) aumentou a atividade da enzima  $\beta$ -galactosidase em 39%. GUIMARÃES *et al.* (2008) utilizou a temperatura de 60 °C para inocular o microrganismo *Aspergillus niveus* para a produção da enzima, obtendo 3,9 U de atividade enzimática.

#### 4. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados, pode-se concluir que todos os microrganismos apresentaram maior capacidade para a produção de  $\beta$ -galactosidase quando foram inoculados no tratamento controle, que compreende as condições usuais para o crescimento microbiano (50 % de umidade e temperatura de 30 °C). Apesar dos tratamentos contendo lactose apresentarem diferença significativa em relação ao tratamento controle, este ainda foi o melhor para a produção enzimática, sugerindo que os microrganismos em estudo não são dependentes da lactose para a produção de  $\beta$ -galactosidase.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, M.M. **Síntese de galactooligossacarídeos por  $\beta$ -Galactosidase de *Scopulariopsis* sp a partir da lactose.** Campinas, 2003. 162p. Tese de Doutorado, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

BECERRA, M.; BAROLI, B.; FADDA, A. M.; BLANCO MÉNDEZ, J.; GONZÁLEZ SISO, M.I. Lactose bioconversion by calcium-alginate immobilization of *Kluyveromyces lactis* cells. **Enzyme and Microbial Technology**, v.29, p.506-512, 2001.

BLANCH, H.W.; CLARK, D.S Principles of catalysis In: Biochemical Engineering. New York. Editora Marcel Dekker. 1997.

GEKAS, V.; LOPEZ-LEIVA, M. Hidrolysis of lactose: A Literature Review. **Process Biochemistry**, v.20, p.2-12, 1985.

GUIMARÃES, L. H. S.; SOMERA, A. F.; TORENZI, H. F.; POLIZELI, M. L. T. M.; JORGE, J. A. Production of b-fructofuranosidases by *Aspergillus niveus* using agroindustrial residues as carbon sources: Characterization of an intracellular enzyme accumulated in the presence of glucose. **Process Biochem**, In Press, 2008.

HOLSINGER, V.H. Physical and chemical properties of lactose. In: Lactose, water, salts and vitamins, London, **Advanced Dairy Chemistry**, v.3, p.1-38, 1997.

HSU, C. A.; YU, R. C.; CHOU, C. C. Production of  $\beta$ -galactosidase by *Bifidobacteria* as influenced by various culture conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v.104, n.2, p.197-206, 2005.

- ISHIKAWA, E.; SAKAI, T.; IKEMURA, H.; MATSUMOTO, K.; ABE, H. Identification, cloning and characterization of a *Sporobolomyces singularis*  $\beta$ -galactosidase like enzyme involved in galacto-oligosaccharide production. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.9, n.4, p.331-339, 2005.
- MAHONEY, R.R. Lactose: Enzymatic Modification. In: Lactose, water, salts and vitamins, London, **Advanced Dairy Chemistry**, v.3, p.77-125, 1997.
- NAGY, Z.; KIS, T.; SZENTIRMAI, A.; BIRO, S.  $\beta$ -galactosidase of *Penicillium chrysogenum*: production, purification and characterization of the enzyme. **Protein Expression and Purification**, v.21, p.24-29, 2001.
- NAKANO, H. Recente japanese development in the enzymatic production and application oligosaccharides. Apresentado no Seminar on enzyme and bacterial techonolgy, 1998. Campinas, Japon International Cooperation Agency (s.d.), 2007.
- ONISHI, N.; TANAKA, T. Purification and properties of a novel thermostable galacto-oligosaccharide producing  $\beta$ -galactosidases from *Sterigmatomyces elviae* CB8119. **Applied and Environmental Microbiology**, v.61, p.4026-4030, 1995.
- PRENOSIL, J.E.; STUKER, E.; BOURNE, J.R. Formation of oligosaccharides during enzymic lactose hydrolysis. I. State of the art. **Biotechnology and Bioengineering**, v.30, p.1019–1025, 1987.
- ROBERFROID, M. B. Prebiotics: The Concept Revised. **The Journal of Nutrition**, v.137, n.3, Health Module, p.830S, 2007.
- SANTOS, R. **Produção de galactooligossacarídeo por lactase fúngica**. Campinas, 2006. 54p. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

TARI, C.; USTOK, F.; HARSA, S. Optimization of the associative growth of novel yoghurt cultures in the production of biomass,  $\beta$ -galactosidase and lactic acid using response surface methodology. **International Dairy Journal**, In Press, 2008.

## **CAPÍTULO 4:**

### **CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO BRUTO DA ENZIMA $\beta$ - GALACTOSIDASE PARA PRODUÇÃO DE GALACTOOLIGOSSACARÍDEOS**





## CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO BRUTO DA ENZIMA $\beta$ -GALACTOSIDASE PARA PRODUÇÃO DE GALACTOOLIGOSSACARÍDEOS

Rodrigues, Daniele; Pastore, Gláucia Maria

Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, CEP 13083-862 – Campinas-SP.

### RESUMO

Atualmente, um dos desenvolvimentos mais significativos na ciência é o de alimentos funcionais, relacionado ao desenvolvimento de suplementos dietéticos que afetam benéficamente a saúde. Dentre esses podemos citar os galactooligossacarídeos, que é um grupo de oligossacarídeos considerados como carboidratos não digeríveis devido sua resistência à hidrólise das enzimas do intestino. Dentre os benefícios da ingestão de galactooligossacarídeos estão o aumento da população de bifidobactérias no cólon e, com isso, a redução dos níveis de bactérias patogênicas, além do aumento da absorção de cálcio e a redução do risco de câncer de cólon. A produção dos galactooligossacarídeos tem sido estudada extensivamente em microrganismos, através da reação de transgalactosilação enzimática catalisada pela  $\beta$ -galactosidase. O principal objetivo desse trabalho foi caracterizar o extrato bruto da enzima  $\beta$ -galactosidase do microrganismo *Aspergillus sp* (LB-32) para a produção de galactooligossacarídeo. As variáveis estudadas foram: temperatura (35, 45, 55 e 65 °C), pH (4, 5, 6 e 7), concentração de lactose inicial (20, 30, 40 e 50%) e concentração do extrato enzimático bruto liofilizado (52, 104, 156 e 208 U). De todos os ensaios, foram retiradas alíquotas depois de 6, 12, 24, 36, 48 e 72 horas de reação. Para avaliar a influência do tempo na síntese de galactooligossacarídeo, foi realizada uma curva cinética para medir a produção em 3, 6, 9, 12, 18, 24, 30, 36, 48 e 72 horas de reação. Nossos resultados mostraram que temperaturas mais altas (65 °C) e valores de pH mais baixos (pH 4) favoreceram a produção de 4'galactosil-lactose. A concentração inicial de 50% de lactose foi desfavorável devido à precipitação da mesma, estando a maior produção de galactooligossacarídeo no valor referente a 40% de lactose. O aumento na concentração enzimática foi diretamente proporcional ao aumento da produção de 4'galactosil-lactose, obtendo o melhor resultado com a utilização de 208 U. Todos os ensaios mostraram melhores resultados quando a reação atingiu 48 horas. Através da curva cinética, notou-se que a produção de galactooligossacarídeo inicia-se depois de 3 horas de reação e atinge o máximo de produção em 48 horas. Nosso melhor resultado foi obtido com o uso da temperatura em 65 °C, produzindo 12,10% de 4'galactosil-lactose, através da conversão de 31,27% da lactose presente no meio.

Termos de indexação:  $\beta$ -galactosidase, galactooligossacarídeos, *Aspergillus sp*.

**ABSTRACT**

Actually, one of the most significant development in science are functional foods, connected with the development of dietetic supplement that affects beneficially the health. Among these, we can mention the galactooligosaccharides, that is a group of oligosaccharides considered as non-digestible carbohydrates due to their resistance to hydrolysis of intestine enzymes. Among the benefits obtained with galactooligosaccharides ingestion are the increase of bifidobacteria population in the colon and, by their antagonistic effect, the reduction of the pathogenic bacteria level, over the increase of calcium absorption and the reduction of colon's cancer risks. The production of galactooligosaccharides has been extensively studied in microorganisms, through the transgalactosylation reaction catalyzed by  $\beta$ -galactosidase enzyme. The aim of this work was to characterize the brute extract of  $\beta$ -galactosidase enzyme of the microorganism *Aspergillus sp* (LB-32) to produce galactooligosaccharide. The studied variables were: temperature (35, 45, 55 and 65 °C), pH (4, 5, 6 and 7), initial lactose concentration (20, 30, 40 and 50%) and lyophilized brute extract concentration (52, 104, 156 and 208 U). Aliquots were took out from all tests after 6, 12, 24, 36, 48 and 72 hours of reaction. To evaluate the time influence in galactooligosaccharides syntesis, it was realized a kinetic curve to measure the production in 3, 6, 9, 12, 18, 24, 36, 48 and 72 hours of reaction. Our results showed that higher temperatures (65 °C) and lower pH values (pH 4) promoted the production of 4'galactosil-lactose. The initial lactose concentration of 50% was disadvantageous because of lactose precipitation, being the best production of galactooligosaccharide with 40% of initial lactose. The increase in the enzymatic concentration was directly proportional to the increase of 4'galactosil-lactose production, obtaining the best result with 208 U of enzyme. All the tests showed the best results in 48 hours of reaction. The kinetic curve showed that the production of galactooligosaccharides starts after 3 hours of reaction, and reaches the top of production in 48 hours. Our best result was obtained using 65 °C of temperature, producing 12,10% of 4'galactosil-lactose through 31,27% of lactose conversion.

Key words:  $\beta$ -galactosidase, galactooligosaccharides, *Aspergillus sp*.

**1. INTRODUÇÃO**

Os galactooligosacarídeos são compostos por moléculas de galactose ligadas à lactose, sendo formados de tri a hexassacarídeos com 2 a 5 unidades de galactose (SAKO *et al.*, 1999). São produzidos através da reação de transgalactosilação catalizada pela enzima  $\beta$ -galactosidase, produzindo oligômeros de cadeias com diferentes graus de polimerização (PRENOSIL *et*

*al.*, 1987). Atualmente é um dos ingredientes alimentares mais utilizados nas indústrias devido suas características físico-químicas, que proporcionam uma melhora nas características sensoriais dos alimentos, e principalmente devido suas características fisiológicas. São classificados como prebióticos devido aos efeitos benéficos na proliferação das bifidobactérias no cólon humano e redução das bactérias deterioradoras (NAKANO, 2007). A ingestão de galactooligossacarídeos também aumenta a mineralização óssea e a resistência contra fraturas devido a estimulação da absorção de cálcio (BROUNS e VERMEER, 2000). São usados na fabricação de gomas de mascar, confeitos, iogurtes e bebidas como açúcares de baixa cariogenicidade, pois não são metabolizados pela microflora bucal para formar ácidos e poliglucanas. Diversos trabalhos na literatura avaliam a produção desse ingrediente, utilizando distintas linhagens, assim como processos diferenciados. A formação de GOS a partir de lactose é influenciada por diversos fatores como a fonte e concentração da enzima, pH, temperatura e concentração do substrato (MAHONEY, 1998; RUSTOM *et al.*, 1998). MARTÍNEZ-VILLALEUNGA e colaboradores (2007) estudaram a otimização das condições para produção de GOS utilizando as variáveis temperatura, pH, concentração enzimática e concentração de lactose.

Através das considerações acima levantadas elucida-se a importância do estudo dos parâmetros do processo para a produção de galactooligossacarídeos, visando obter um processo factível para a produção deste importante ingrediente para a indústria alimentícia.

Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da temperatura, pH, concentração de lactose, concentração enzimática e tempo na produção de galactooligossacarídeos utilizando a enzima  $\beta$ -Galactosidase do microrganismo *Aspergillus sp* (LB-32).

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. Microrganismo produtor da enzima $\beta$ -galactosidase

O microrganismo utilizado neste trabalho foi o *Aspergillus sp* (LB-32), retirado da coleção de microrganismos do Laboratório de Bioaromas (Departamento de Ciência de Alimentos – UNICAMP).

### 2.2. Produção do extrato enzimático bruto liofilizado

#### 2.2.1. Preparação do inóculo

O microrganismo foi semeado em tubo contendo o meio PDA e incubado em estufa a uma temperatura de 30 °C por 7 dias. Em seguida, foi adicionado 10 mL de água destilada estéril e feita a raspagem com alça de platina para a liberação dos esporos, obtendo-se assim uma suspensão microbiana de concentração celular igual a  $10^8$  esporos/mL (ALMEIDA, 2003).

#### 2.2.2. Fermentação

A fermentação foi realizada em meio semi-sólido composto por farelo de trigo e água na proporção 1:1 (p/v). Utilizou-se erlenmeyer de 500 mL contendo 20 g de meio previamente esterilizados a 121 °C por 15 minutos. Adicionou-se 1,0 mL da suspensão microbiana (item 2.2.1) no erlenmeyer contendo o meio de cultura, sendo em seguida incubado em estufa com temperatura de 30 °C durante 7 dias (SANTOS, 2006).

#### 2.2.3. Extração enzimática

Após os 7 dias de incubação, foi adicionado 100 mL de água destilada no erlenmeyer e o meio foi triturado com bastão de vidro para a liberação das enzimas. A mistura ficou em repouso durante 1 hora e, em seguida, foi filtrada com gaze. Ao sobrenadante, foi adicionado etanol resfriado a 8 °C até a concentração de 70% para que ocorresse a precipitação enzimática. Após 1 hora de repouso em banho de gelo, o extrato enzimático bruto foi centrifugado

a 10000 rpm com temperatura de 4 °C por 10 minutos e o precipitado foi liofilizado. O extrato enzimático bruto liofilizado foi guardado no congelador a -15 °C para posterior análise (ALMEIDA, 2003).

### 2.3. Determinação da atividade de $\beta$ -galactosidase

A determinação da atividade do extrato enzimático bruto liofilizado foi realizada segundo SANTOS (2006), utilizando o substrato sintético ONPG (o-nitrofenil  $\beta$ -D-galactopiranosídeo). O meio de reação foi composto por 1,55 mL de tampão acetato de sódio 0,1 M e pH 5,0 contendo o substrato ONPG na concentração 0,25% e 0,15 mL do extrato enzimático bruto liofilizado na concentração 1,0 mg/mL, sendo a mistura incubada em banho com temperatura de 60 °C durante 15 minutos. A reação foi paralisada com 0,15 mL de carbonato de sódio na concentração 10%. O produto da reação é o cromóforo o-nitrofenol, cuja coloração é amarela e pode ser medido no espectrofotômetro em absorbância 420 nm. A calibração do equipamento foi feita através da amostra branco, composta pelos mesmos componentes da reação, porém a solução enzimática foi colocada ao mesmo tempo que o carbonato de sódio 10%, para que a reação fosse paralisada no tempo zero. A atividade enzimática foi calculada através de uma curva padrão de o-nitrofenol. Uma unidade de atividade de  $\beta$ -galactosidase foi definida como a quantidade de enzima que libera 1  $\mu$ mol de o-nitrofenol por minuto de reação.

### 2.4. Caracterização da enzima $\beta$ -Galactosidase para produção de galactooligossacarídeos

Para o estudo da produção de galactooligossacarídeos, foram avaliados os efeitos da temperatura, do pH e das concentrações de lactose e do extrato enzimático bruto liofilizado. O meio de reação foi constituído por tampão acetato de sódio, lactose e extrato enzimático bruto liofilizado. Utilizou-se erlenmeyers de 50 mL contendo 10 mL de meio, que foram incubados sob agitação constante de 100 rpm. Foram retiradas alíquotas de 1,5 mL depois de

6, 12, 24, 36, 48 e 72 horas de reação para avaliar a influência do tempo na reação. Em todos os experimentos, a reação foi paralisada por inativação da enzima em banho de água fervente por 10 minutos.

Os produtos da reação foram analisados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e detectados por índice de refração. Foi utilizado um Cromatógrafo Líquido Waters com coluna KS-801 (300 x 7,8 mm) e, como fase móvel, foi utilizada água ultra pura a um fluxo de 1 mL/minuto e temperatura de 80 °C. Os carboidratos foram identificados através da comparação com o tempo de retenção dos padrões lactose, glicose, galactose e 4'galactosil-lactose (tetrassacarídeo). A quantificação foi realizada segundo JUNG e LEE (2008) através da análise das áreas da lactose obtidas no tempo zero e depois de 24 horas de reação, e da área do galactooligossacarídeo formado no final da reação.

$$\text{Conversão da lactose} = \frac{\text{Concentração inicial da lactose} - \text{Concentração final da lactose}}{\text{Concentração inicial da lactose}} \times 100$$

$$\text{Produção de GOS} = \frac{\text{Concentração de oligossacarídeos}}{\text{Concentração inicial da lactose}} \times 100$$

#### 2.4.1. Efeito da temperatura na produção de galactooligossacarídeos

Para avaliar a influência da temperatura na produção de galactooligossacarídeos, foi estudada em uma faixa entre 35 e 65 °C, com intervalos de 10 °C. Utilizou-se uma solução de lactose inicial a 40% em tampão acetato de sódio 0,1 M com pH 5,0 e 104 U de enzima.

#### 2.4.2. Efeito do pH na produção de galactooligossacarídeos

O efeito do pH foi avaliado em um sistema de reação contendo solução de lactose inicial a 40% em tampão acetato de sódio 0,1 M com os seguintes valores de pH: 4,0, 5,0, 6,0 e 7,0. Utilizou-se 104 U de enzima e a solução foi incubada em banho a uma temperatura de 45 °C.

#### 2.4.3. Efeito da concentração do extrato enzimático bruto liofilizado na produção de galactooligossacarídeos

O efeito da concentração do extrato enzimático bruto liofilizado na conversão da lactose em galactooligossacarídeos foi avaliado utilizando-se 52, 104, 156 e 208 U de  $\beta$ -Galactosidase em tampão acetato de sódio 0,1 M e pH 5,0 contendo 40% de lactose. A solução foi incubada em banho com temperatura de 45 °C.

#### 2.4.4. Efeito da concentração inicial de lactose na produção de galactooligossacarídeos

Para avaliar a influência da concentração da lactose na produção de galactooligossacarídeos, foram utilizados 20, 30, 40 e 50% de lactose em tampão acetato de sódio 0,1 M com pH 5,0 e 104 U de enzima. A solução foi incubada em banho a uma temperatura de 45 °C.

#### 2.4.5. Cinética para produção de galactooligossacarídeos

Para determinar a influência do tempo na produção de galactooligossacarídeos, elaborou-se uma curva cinética onde a produção foi medida após 3, 6, 9, 12, 18, 24, 30, 36, 48 e 72 horas de reação. O meio foi composto por uma solução enzimática na concentração 104 U em tampão acetato de sódio 0,1 M e pH 5,0 contendo 40% de lactose. Foram utilizados erlenmeyers de 50 mL contendo 10 mL de tampão acetato de sódio 0,1 M pH 5,0, 4 g de lactose e 10 mg do extrato enzimático bruto liofilizado. Os erlenmeyers foram incubados em banho-maria com temperatura de 45 °C e agitação de 100 rpm. A reação foi paralisada em banho fervente a 100 °C durante 10 minutos.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. Caracterização da enzima $\beta$ -Galactosidase para produção de galactooligossacarídeos

No estudo sobre a caracterização da enzima  $\beta$ -Galactosidase extraída do microrganismo *Aspergillus sp* (LB-32), foram avaliados os efeitos da temperatura, do pH e das concentrações de lactose e do extrato enzimático bruto liofilizado para a produção de galactooligossacarídeos. Foram retiradas alíquotas de 1,5 mL depois de 6, 12, 24, 36, 48 e 72 horas de reação para avaliar a influência do tempo na reação.

##### 3.1.1. Efeito da temperatura na produção de galactooligossacarídeos

A influência da temperatura na produção de galactooligossacarídeo foi avaliada na faixa entre 35 e 65 °C, com intervalos de 10 °C. Utilizou-se uma solução contendo 40% de lactose inicial em tampão acetato de sódio 0,1 M com pH 5,0 e 104 U de enzima. A Figura 4.1 mostra o efeito da temperatura na síntese de 4'galactosil-lactose. Através da análise dos resultados, foi observado que a temperatura de 65 °C favoreceu a produção de galactooligossacarídeo, atingindo o máximo de produção em 48 horas com a formação de 12,10% de 4'galactosil-lactose, através da conversão de 31,27% da lactose. A utilização de temperaturas mais elevadas para aumentar a produção tem sido relatada por diversos autores (REUTER *et al.*, 1999; HAIDER e HUSAIN, 2008).



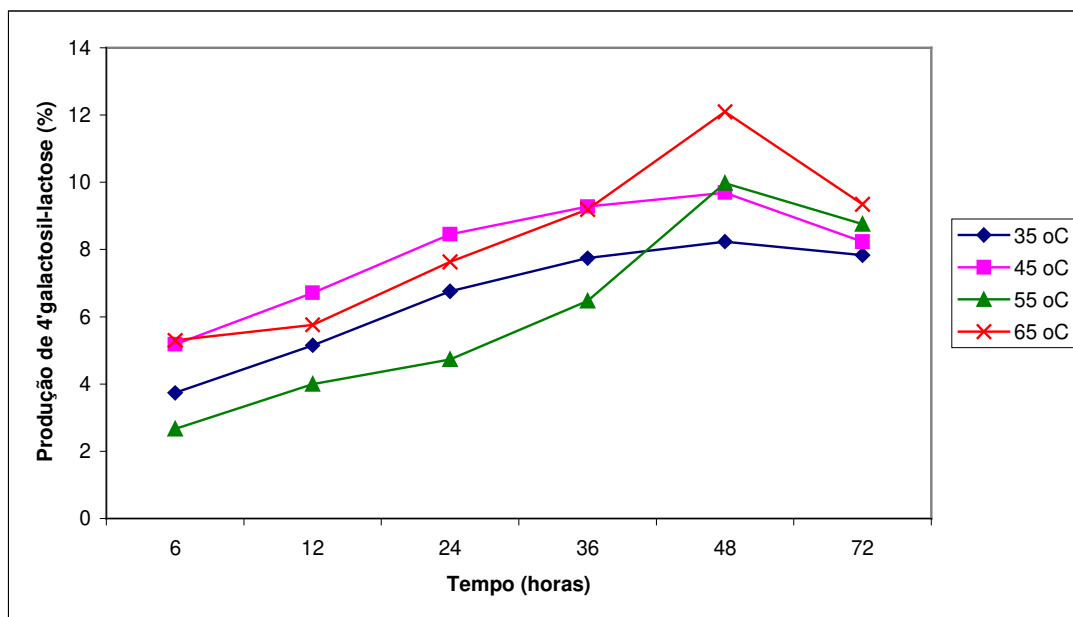


Figura 4.1 – Efeito da temperatura e do tempo de reação na síntese de 4'galactosil-lactose.

Todas as temperaturas estudadas tiveram o máximo de produção de 4'galactosil-lactose em 48 horas de reação, seguido por um decréscimo da produção em 72 horas. Segundo ALMEIDA (2003), após um período prolongado de reação, a síntese de galactooligossacarídeo começa a diminuir devido à inibição da reação por algum produto formado ou por hidrólise dos oligossacarídeos. MARTÍNEZ-VILLALUENGA e colaboradores (2008) comprovaram que a presença de glicose no meio inibe a ação de transferase da  $\beta$ -galactosidase, provocando uma diminuição na síntese de galactooligossacarídeos. GUVEN *et al.* (2007) comprovaram em seus estudos que tanto a glicose quanto a galactose podem inibir a síntese de galactooligossacarídeos. Essa teoria foi comprovada mais tarde por NERI *et al.* (2008), alegando que a alta concentração de galactose no meio pode favorecer a reação inversa da hidrólise, diminuindo assim a produção de galactooligossacarídeos.

### 3.1.2. Efeito do pH na produção de galactooligossacarídeos

Diferentes valores de pH foram testados para a produção de galactooligossacarídeo. Foi utilizado um sistema de reação contendo solução de lactose inicial a 40% em tampão acetato de sódio 0,1 M com os seguintes valores de pH: 4,0, 5,0, 6,0 e 7,0. Utilizou-se 104 U de enzima e a solução foi incubada em banho com temperatura de 45 °C.

De acordo com a Figura 4.2, pode-se observar que a enzima  $\beta$ -galactosidase teve uma melhor atividade em pH 4,0 desde o início da reação. Valores mais baixos de pH têm sido bastante utilizados nas atuais pesquisas para a produção de galactooligossacarídeos (NERI *et al.*, 2008; HAIDER e HUSAIN, 2008).

Todos os valores de pH estudados tiveram sua produção otimizada em 48 horas de reação. Os sistemas com pH mais próximos da neutralidade não foram muito favoráveis para a reação, destacando-se que após 6 horas de reação ainda não havia sido formado nenhum galactooligossacarídeo no meio referente ao pH 6,0. Esse resultado contradiz o resultado obtido por ALMEIDA (2003), que estudou uma faixa de pH entre 3,5 e 8,5 e obteve maiores rendimentos em 6 horas de reação independente do valor do pH utilizado.

A maior produção de 4'galactosil-lactose aconteceu após 48 horas no sistema de reação com pH 4,0. Essa condição proporcionou a formação de 8,94% do tetrassacarídeo, com 27,25% de conversão da lactose. NERI e colaboradores (2008), estudando a produção de galactooligossacarídeos à partir de *Aspergillus oryzae*, utilizaram um sistema de reação com pH 4,5 e obtiveram 40% de conversão de lactose, formando 26% de galactooligossacarídeos.

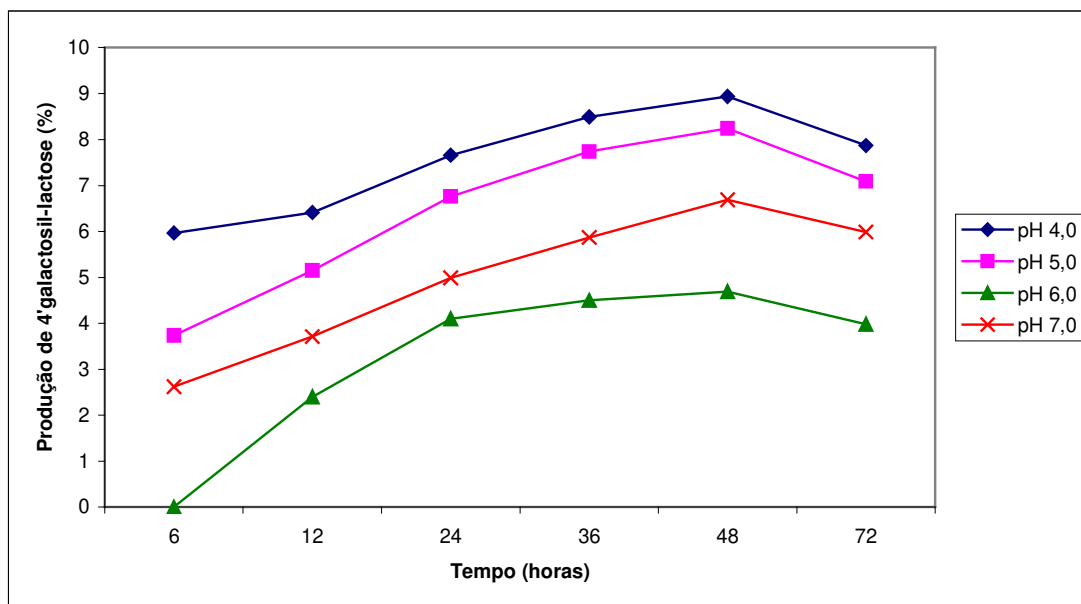


Figura 4.2 – Efeito do pH e do tempo de reação na síntese de 4'galactosil-lactose.

### 3.1.3. Efeito da concentração do extrato enzimático bruto liofilizado na produção de galactooligossacarídeos

Para avaliar o efeito da concentração do extrato enzimático bruto liofilizado na conversão da lactose em galactooligossacarídeos foram utilizadas 52, 104, 156 e 208 U de  $\beta$ -Galactosidase em tampão acetato de sódio 0,1 M e pH 5,0 contendo 40% de lactose, sendo a solução incubada em banho com temperatura de 45 °C.

A Figura 4.3 mostra que, em todas as concentrações enzimáticas utilizadas, houve um aumento gradativo na síntese de galactooligossacarídeo até o período de 48 horas, seguido por um decréscimo na produção quando a reação atingiu o tempo de 72 horas, talvez em decorrência de hidrólise dos oligossacarídeos ou inibição da reação pelos produtos formados.

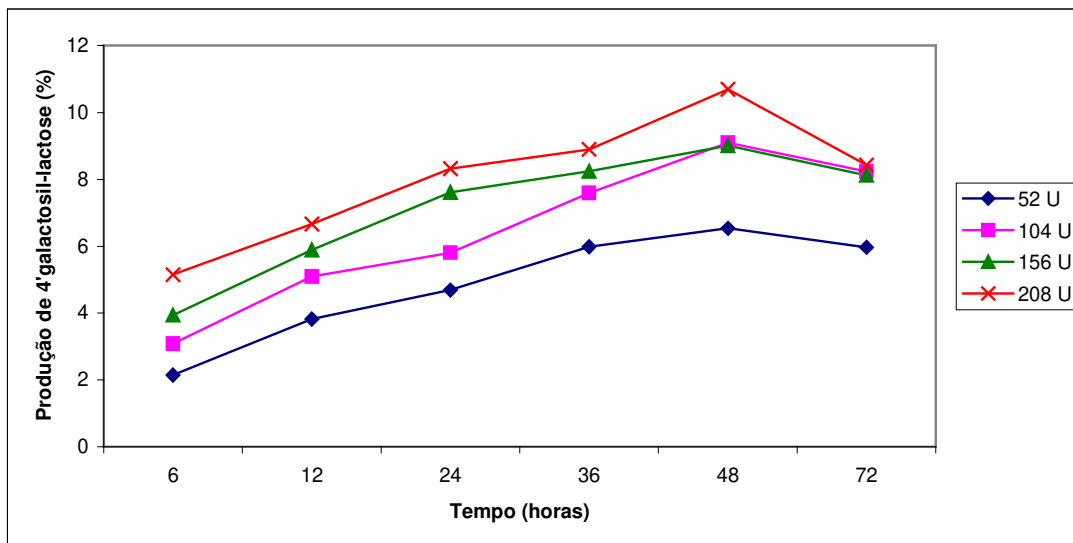


Figura 4.3 – Efeito da concentração do extrato enzimático bruto liofilizado e do tempo de reação na síntese de 4'galactosil-lactose.

A partir dos resultados, pode-se observar que a produção de galactooligossacarídeo foi aumentando juntamente com o aumento da concentração enzimática, atingindo seu máximo com a concentração de 208U, que converteu 17,36% da lactose e produziu 10,69% de 4'galactosil-lactose. Esses resultados contradizem os resultados obtidos por alguns autores (MARTÍNEZ-VILLALUENGA *et al.*, 2008; ALMEIDA, 2003 e SANTOS, 2006) que obtiveram o máximo de produção com menores concentrações enzimáticas, porém comprovam a teoria dita por MACFARLANE *et al.*, (2007) e CHOCKCHAIWASDEE *et al.* (2005) de que a quantidade de galactooligossacarídeo produzido a partir de lactose depende também da concentração de  $\beta$ -galactosidase.

Porém, vale lembrar que fontes distintas da enzima  $\beta$ -galactosidase podem apresentar propriedades diferentes na síntese de galactooligossacarídeos, e a eficiência da transgalactosilação e os componentes dos produtos finais dependem de qual microrganismo a  $\beta$ -galactosidase foi produzida.

### 3.1.4. Efeito da concentração inicial de lactose na produção de galactooligossacarídeos

A influência da concentração inicial de lactose na produção de galactooligossacarídeos foi avaliada utilizando-se concentrações de 20, 30, 40 e 50% de lactose em tampão acetato de sódio 0,1 M com pH 5,0 e 104 U de enzima. A solução foi incubada em banho a uma temperatura de 45 °C.

Diversos autores têm demonstrado que maiores concentrações de lactose favorecem a produção de galactooligossacarídeos (BURVAL *et al.*, 1996, LÓPEZ-LEIVA e GUZMAN, 1995, ALBAYRAK e YANG, 2002). Nossos resultados, representados na Figura 4.4, mostraram que ocorreu maior produção de 4'galactosil-lactose utilizando-se 40% de lactose. Nessa condição, houve 31,40% de conversão da lactose e produção de 9,24% de 4'galactosil-lactose. Quando a concentração de lactose foi aumentada para 50%, houve uma queda na produção devido à precipitação da mesma. De acordo com ALMEIDA (2003), isso se deve porque a lactose cristaliza facilmente em altas concentrações, sendo a concentração de 40% ideal para as condições de trabalho. SANTOS (2006) e CHEN *et al.* (2001) obtiveram o máximo de produção utilizando a concentração de 40% de lactose.

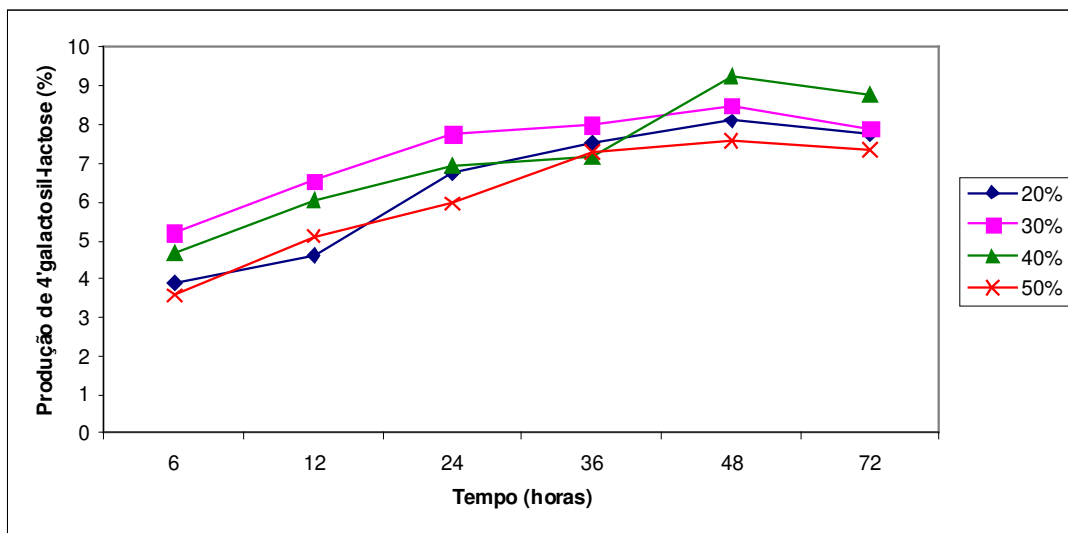


Figura 4.4 – Efeito da concentração inicial da lactose e do tempo de reação na síntese de 4'galactosil-lactose.

### 3.1.5. Cinética para produção de galactooligossacarídeos

A influência do tempo na produção de galactooligossacarídeos foi determinada através de uma curva cinética, onde a produção foi medida após 3, 6, 9, 12, 18, 24, 30, 36, 48 e 72 horas de reação. O meio foi composto por uma solução enzimática na concentração 104 U em tampão acetato de sódio 0,1 M e pH 5,0 contendo 40% de lactose, sendo a solução incubada em banho-maria com temperatura de 45 °C.

A construção de uma curva cinética é bastante interessante para as reações enzimáticas, pois determina o tempo mínimo necessário para que ocorra o máximo de produção do produto desejado. A alta produção de galactooligossacarídeos é de grande interesse, pois trata-se de um ingrediente alimentar muito utilizado nas indústrias devido às suas características físico-químicas e fisiológicas.

A Figura 4.5 mostra que nas três primeiras horas de reação não houve formação de 4'galactosil-lactose. À partir de então, houve uma aceleração na produção até atingir 12 horas de reação. No período entre 12 e 24 horas, a reação manteve-se estável e, em seguida, pode-se notar novamente um aumento na produção. A maior síntese de galactooligossacarídeo ocorreu em 48 horas, seguido por um decréscimo na produção quando a reação atingiu o tempo de 72 horas.

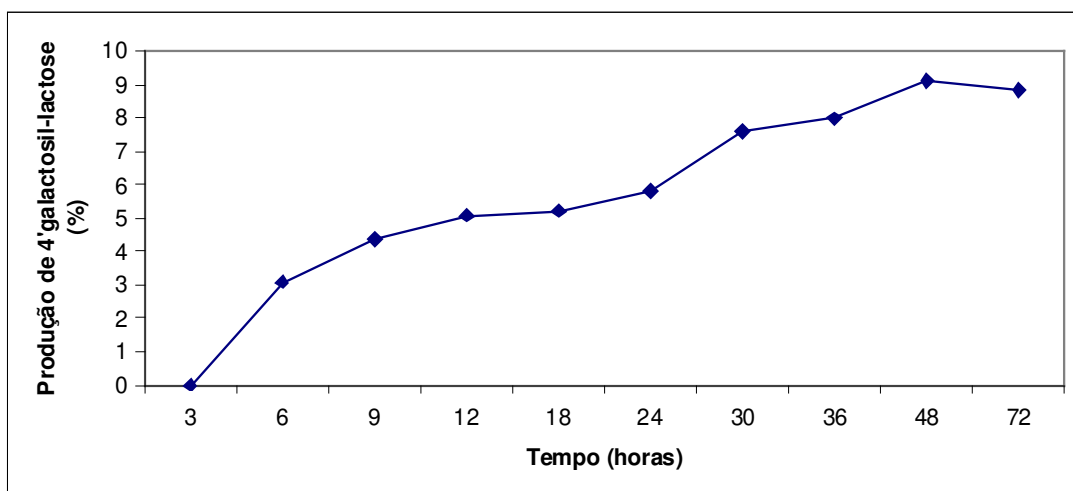


Figura 4.5 – Curva de produção de 4'galactosil-lactose em relação ao tempo de reação.

A tendência de diminuição da produção após um certo período de tempo pode ser explicada pelo aumento da quantidade de glicose liberada, considerada um inibidor da reação. Também por apresentarem maior peso molecular que a lactose, os oligossacarídeos podem ser preferencialmente hidrolisados (GOPAL *et al.*, 2003).

A Figura 4.6 mostra que, com o passar do tempo da reação, ocorre um aumento relativamente igual nas concentrações de 4'galactosil-lactose e glicose, enquanto que a galactose mantém-se em concentrações mais baixas por estar sendo utilizada na formação do galactooligossacarídeo. Isso sugere que a enzima  $\beta$ -galactosidase extraída do microrganismo *Aspergillus sp* (LB-32) possui, além da atividade de hidrólise, a atividade de transgalactosilação.

A maior produção de galactooligossacarídeo ocorreu em 48 horas, onde houve a conversão de 24,45% da lactose e formação de 9,1% de 4'galactosil-lactose.

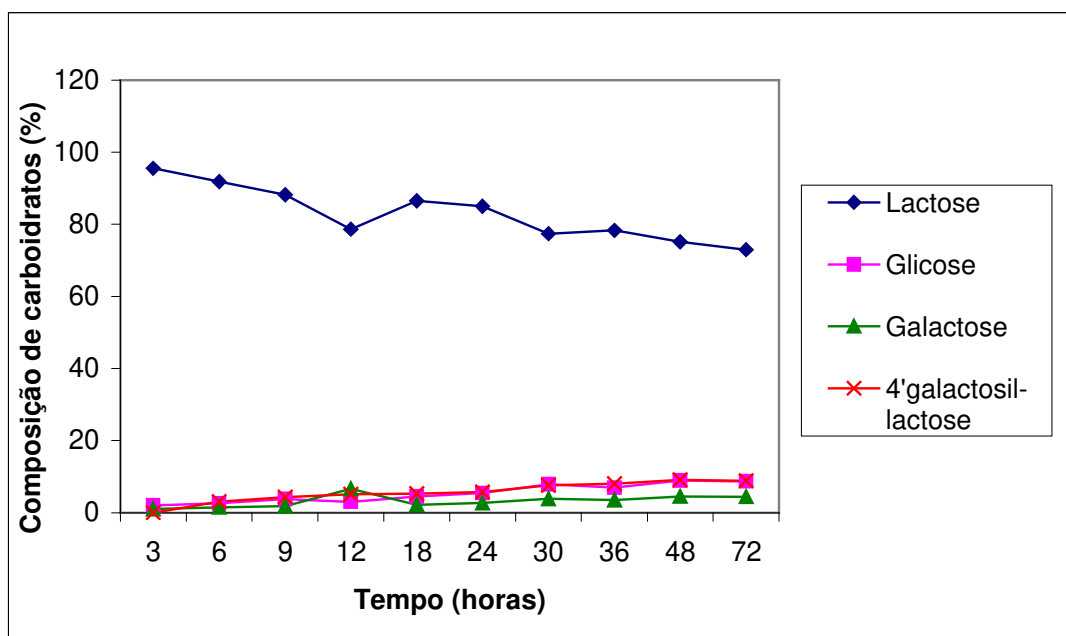


Figura 4.6 – Curva de produção de 4'galactosil-lactose, glicose e galactose através da reação de transgalactosilação da lactose catalisada pela enzima  $\beta$ -galactosidase.

A produção de galactooligossacarídeos tem sido bastante estudada, principalmente devido às suas propriedades funcionais. Os resultados obtidos

neste trabalho estão próximos aos encontrados por outros autores, apesar de serem em diferentes condições experimentais. CARDELLE-COBAS e colaboradores (2008), usando a  $\beta$ -galactosidase de *Aspergillus aculeatus* em meio de reação com pH 6,0 e temperatura de 40 °C, obtiveram 19% de galactooligossacarídeos. HAIDER e HUSAIN (2008) verificaram que as melhores condições de atuação da  $\beta$ -galactosidase foi em pH 4,6 e temperatura de 50 °C. ONISHI e TANAKA (1997) obtiveram 72 mg/mL de galactooligossacarídeos após 24 horas de incubação da enzima com 20% de lactose, pH 5,0 e temperatura de 60 °C. Estudando o microrganismo *Aspergillus oryzae*, RUSTOM *et al.* (1998) produziram 17,9% de oligossacarídeos em meio com pH 5,0 e temperatura de 35 °C.

#### 4. CONCLUSÃO

A  $\beta$ -galactosidase extraída do microrganismo *Aspergillus sp* (LB-32) apresentou atividade de hidrólise e de transgalactosilação, produzindo o galactooligossacarídeo 4'galactosil-lactose.

Os maiores rendimentos de produção de galactooligossacarídeos foram obtidos com 208 U de  $\beta$ -galactosidase, sendo o aumento da concentração da enzima proporcional à produção de galactooligossacarídeo.

As maiores produções ocorreram utilizando sistemas de reação com valores mais baixos de pH, tendo a máxima produção com pH 4,0.

A reação foi favorecida com o aumento da temperatura, preferencialmente utilizando 65 °C.

O uso de concentrações elevadas de lactose foi favorável para a produção de galactooligossacarídeos, especialmente a concentração de 40%, comprovando a teoria de diversos autores. O aumento dessa concentração para 50% não foi viável devido à cristalização da lactose.

A atividade de transgalactosilação da  $\beta$ -galactosidase parece ser inibida pelo aumento de glicose, havendo a necessidade de estudos para retirar esse monossacarídeo do sistema de reação.



## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBAYRAK, N.; YANG, S.T. Production of galactooligosaccharides from lactose by *Aspergillus oryzae* beta-galactosidase immobilized on cotton cloth. **Biotechnology and Bioengineering**, v.77, n.1, p.8-19, 2002.
- ALMEIDA, M.M. **Síntese de galactooligossacarídeos por  $\beta$ -Galactosidase de *Scopulariopsis* sp a partir da lactose**. Campinas, 2003. 162p. Tese de Doutorado, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- BROUNS, F.; VERMEER, C. Functional food ingredients for reducing the risks of osteoporosis. **Trends in Food Science & Technology**. v.11, p.22-33, 2000.
- BURVALL, A.; ASP, N.G.; DAHLQVIST, A. Oligosaccharide formation during hydrolysis of lactose with *Saccharomyces lactis* lactase (Maxilat) – Part 1. **Food Chemistry**, v.7, n.11, p.353-361, 1996.
- CARDELLE-COBAS, A.; MARTÍNEZ-VILLALUENGA, C.; SANZ, M. L.; MONTILLA, A. Gas chromatographic–mass spectrometric analysis of galactosyl derivatives. **Food Chemistry**, In Press, 2008.
- CHEN, S. X.; WEI, D. Z.; HU, Z. H. Synthesis of galacto-oligosaccharides in AOT/isooctane reverse micelles by  $\beta$ -galactosidase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.16, p.194-114, 2001.
- CHOCKCHASAWASDEE, S.; ATHANASOPOULOS, V. I.; NIRANJAN, K.; RASTALL, R. A. Synthesis of galacto-oligosaccharide from lactose using galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*: studies on membrane-fitted bioreactors. **Biotechnology and Bioengineering**, v.89, n.4, p.434-443, 2005.

GOPAL, P. K.; PRASAD, J; GLL, H. S. Effects on the consumption of *Bifidobacterium lactis* HN019 (DR10tm) and galacto-oligosaccharides on the microflora of the gastrointestinal tract in human subjects. **Nutrition Research**, v.23, p.1313-1328, 2003.

GUVEN, R. G.; GUVEN, K.; POLI, A.; NICOLAUS, B. Purification and some properties of a b-galactosidase from the thermoacidophilic *Alicyclobacillus acidocaldarius* subsp. *rittmannii* isolated from Antarctica. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p.1570-1577, 2007.

HAIDER, T.; HUSAIN, Q. Immobilization of  $\beta$ -galactosidase from *Aspergillus oryzae* via immunoaffinity support, **Biochem. Eng. J.**. In Press, 2008.

JUNG, S.J.; LEE, B.H. Production and application of galactooligosaccharides from lactose by a recombinant  $\beta$ -Galactosidase of *Bifidobacterium infantis* overproduced by *Pichia pastoris*. **Food Science and Biotechnology**, v.17, n.3, p.514-518, 2008.

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

MACFARLANE, G.T., STEED H., MACFARLANE, S. Bacterial metabolism and health-related effects of galacto-oligosaccharides and other prebiotics. **Journal of Applied Microbiology**, v.104, n.2, p.305-344, 2007.

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

MARTÍNEZ-VILLALUENGA, C.; CARDELLE-COBAS, A.; CORZO, N.; OLANO, A.; VILLAMIEL, M. Optimization of conditions for galactooligosaccharide syntesis during lactose hydrolysis by  $\beta$ -Galactosidase from *Kluyveromyces*

- lactis* (Lactozym 3000 L HP G). **Food Chemistry**, v.107, p.258-264, 2008.
- NAKANO, H. Recente japanese development in the enzymatic production and application oligosaccharides. Apresentado no Seminar on enzyme and bacterial techonolgy, 1998. Campinas, Japon International Cooperation Agency (s.d.), 2007.
- NERI, D.F.M.; BALCÃO, V.M.; COSTA, R.S.; ROCHA, I.C.A.; FERREIRA, E.M.F.; TORRES, D.P.M.; RODRIGUES, L.R.M.; CARVALHO Jr, L.B.; TEIXEIRA, J.A. Galacto-oligosaccharides production during lactose hydrolysis by free *Aspergillus oryzae*  $\beta$ -galactosidase and immobilized on magnetic polysiloxane-polyvinyl alcohol, **Food Chemistry**. In Press, 2008.
- ONISHI, N.; TANAKA, T. Purification and characterization of galacto-oligosaccharide producing  $\beta$ -galactosidase from *Sirobasidium magnum*. **Letters in Applied Microbiology**, v.24, p.82-86, 1997.
- PRENOSIL, J.E., STUKER, E.; BOURNE, J.R. Formation of oligosaccharides during enzymic lactose hydrolysis. I. State of the art. **Biotechnology and Bioengineering**, v.30, p.1019–1025, 1987.
- REUTER, S.; NYGAARD, A. R.; ZIMMERMANN, W.  $\beta$ -Galactooligosaccharide syntesis with  $\beta$ -galactosidases from *Sulfolobulus solfataricus*, *Aspergillus oryzae* and *Escherichia coli*. **Enzyme and Microbial Technology**, v.25, p.509-516, 1999.
- RUSTOM, I.Y.S.; FODA, M.I.; LÓPEZ-LEIVA, M.H. Formation of oligosaccharides from whey UF-permeate by enzymatic hydrolysis – analysis of factors. **Food Chemistry**, v.62, n.2, p.141-147, 1998.
- SANTOS, R. **Produção de galactooligossacarídeo por lactase fúngica**. Campinas, 2006. 54p. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Engenharia

de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

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

## CONCLUSÕES GERAIS

A seleção dos microrganismos resultou em 5 linhagens produtoras do tetrassacarídeo 4'galactosil-lactose: *Aspergillus sp* (LB-01), *Aspergillus sp* (LB-32), *Aspergillus sp* (LB-36), *Penicillium sp* (LB-51) e *Scopulariopsis sp* (LB-35).

O substrato farelo de trigo mostrou-se eficiente para o crescimento microbiano, permitindo a produção da enzima  $\beta$ -galactosidase.

O extrato enzimático bruto liofilizado extraído dos microrganismos em estudo foi satisfatório para a produção de galactooligossacarídeos.

Os microrganismos apresentaram maior capacidade para a produção de  $\beta$ -galactosidase quando foram inoculados em condições consideradas usuais para o crescimento microbiano, quais sejam: temperatura de 30 °C, 0% de concentração de lactose e 50% de umidade no meio de cultura.

Os maiores rendimentos para a produção de galactooligossacarídeos foram obtidos com 208 U de  $\beta$ -galactosidase, sendo o aumento da concentração da enzima proporcional à produção de galactooligossacarídeo. A reação foi favorecida com a utilização de temperaturas mais altas (65 °C) e valores de pH mais baixos (pH 4,0). O uso de concentrações elevadas de lactose foi favorável para a produção de galactooligossacarídeos, especialmente a concentração de 40%, comprovando a teoria de diversos autores. O aumento dessa concentração para 50% não foi viável devido à cristalização da lactose.



**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- BEKERS, M.; MARAUSKA, M.; GRUBE, M.; KLARKLINA, D.; DUMA, M. New prebiotics for functional food. **Acta Alimentaria**, v.33, p.31-37, 2004.
- BROUNS, F.; VERMEER, C. Functional food ingredients for reducing the risks of osteoporosis. **Trends in Food Science & Technology**. V. 11, p. 22-33, 2000.
- CRITTENDEN, R.G.; PLAYNE, M.J.; Production on properties and applications of food-grade oligosaccharides. **Trends in Food Science & Technology**., v.7, n.11, p.353-361, 1996.
- MAHONEY, R.R. Galactosyl-oligosaccharide formation during lactose hydrolysis: a review. **Food Chemistry**, v.63, n.2, p.147-154, 1998.
- MARTÍNEZ-VILLALUENGA, C.; CARDELLE-COBAS, A.; CORZO, N.; OLANO, A.; VILLAMIEL, M. Optimization of conditions for galactooligosaccharide syntesis during lactose hydrolysis by  $\beta$ -Galactosidase from *Kluyveromyces lactis* (Lactozym 3000 L HP G). **Food Chemistry**, v.107, p.258-264, 2008.
- MODLER, H.W. Bifidogenic factors – Sources, metabolism and aplications. **International Dairy Journal**. v.4, p.383-407, 1994.
- NAKANO, H. **Recente japanese development in the enzymatic production and application oligosaccharides**. Apresentado no Seminar on enzyme and bacterial techonolgy, 1998. Campinas, Japon International Cooperation Agency (s.d.).
- RUSTOM, I.Y.S.; FODA, M.I.; LÓPEZ-LEIVA, M.H. Formation of oligosaccharides from whey UF-permeate by enzymatic hydrolysis – analysis of factors. **Food**

**Chemistry**, v.62, n.2, p.141-147, 1998.

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

TANIGUCHI, H. Carbohydrate Research and Industry in Japan and the Japanese Society of Applied Glycoscience. **Starch**, v.56, p.1-5, 2004.

TOMOMATSU, H., Health effects of oligosaccharides. **Food Technology**, v.48, n.10, p.61-65, 1994.

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