

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

**PRODUÇÃO DE GALACTOOLIGOSSACARÍDEO
POR LACTASE FÚNGICA**

Rosângela dos Santos

Bióloga

Profa. Dra. Gláucia M. Pastore

Orientadora

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

Campinas
2006

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

Sa59p Santos, Rosângela dos
Produção de galactooligossacarídeo por lactase fúngica / Rosângela dos Santos. -- Campinas, SP: [s.n.], 2006.

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

1. Galactooligossacarídeo. 2. β -galactosidase. 3.
Scopulariopsis. I. Pastore, Gláucia Maria. II. Universidade Estadual
de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

(cars/fea)

Titulo em inglês: Production by galactooligosaccharide for fungic lactase

Palavras-chave em inglês (Keywords: Galactooligosaccharide, β -galactosidase
Scopulariopsis

Titulação: Mestre em Ciências de Alimentos

Banca examinadora: Gláucia Maria Pastore

Yong Kun Park

Elisabete Lourenço da Costa

Fátima Aparecida de Almeida Costa

BANCA EXAMINADORA:

Profa. Dra. Gláucia Maria Pastore
Orientadora

Prof. Dr. Yong Kun Park
FEA/UNICAMP

Profa. Dra. Elisabete Lourenço da Costa
UNISANTOS

Dra. Fátima Aparecida de Almeida Costa
DEA/FEA

A Deus por Tudo que Ele me deu;

A minha orientadora, Profa. Gláucia por ter me acolhido, apoiado em tantos momentos, pela excelente orientação, oportunidade e paciência.

A minha mãe, Regina, pelo amor e dedicação;

A minha querida filha Amanda.

dedico este trabalho.

“... tudo o que é verdadeiro, tudo o que é honesto, tudo o que é justo, tudo o que é puro, tudo o que é amável, tudo o que é de boa fama, se há alguma virtude, e se há algum louvor, nisso pensai”.

Filipenses 4:8

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Yong Kun Park, a Dra. Elisabete Lourenço da Costa, a Dra. Fátima Aparecida de Almeida Costa, pelas correções e sugestões apresentadas.

Aos meus pais Floriano e Regina, aos meus irmãos, Regiane, Rose, Roseli e Reinaldo, aos meus cunhados Rodrigo e Fábio e toda minha família, pelo amor, apoio e dedicação na minha vida e na vida da Amanda.

Aos professores dos cursos de Pós Graduação em Ciência de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos/UNICAMP, por fazerem parte da minha formação.

Aos companheiros de pós-graduação: Janaina, Mariana, Mário, Andréia, Cedenir, Fábio, Ana Paula, Juliano, Luciana. Ao pessoal dos laboratórios de Bioaromas e Bioquímica, em especial a Dora e Reginaldo, pela amizade, carinho e dedicação, e também a Beatriz, Priscila, Ana Paula Simiqueli, Angélica, Lourdes e Liliane, pelo profissionalismo e colaboração neste trabalho. Agradeço a todos pela amizade e apoio ao longo desse tempo.

Aos meus grandes amigos Junior e Janai, pela acolhida, pelo apoio, paciência, confiança e oração, no meu trabalho e na minha vida.

As minhas amigas, Claudia, Sheila e Mariana, pela amizade, e carinho com que me acolheram na moradia estudantil da UNICAMP.

Ao meu amigo Lucas, pela força, conselhos e orações nos momentos difíceis.

À Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), pela oportunidade de realizar este sonho e pela bolsa concedida na moradia estudantil por dois anos.

A Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de Mestrado.

ÍNDICE GERAL

LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE FIGURAS	ix
RESUMO	xi
ABSTRACT	xiii
1 – INTRODUÇÃO	1
2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 – PREBIÓTICOS e PROBIÓTICOS	3
2.2 – Oligossacarídeos	5
2.3 – Galactooligossacarídeos e β -galactosidase	10
2.4 – Benefícios dos Galactooligossacarídeos	15
3 – OBJETIVOS	19
4 – MATERIAIS E MÉTODOS	20
4.1 – Microrganismo utilizado	20
4.2 – Produção de inóculo	20
4.3 – Preparo do extrato enzimático	20
4.4 – Precipitação com álcool etílico	21
4.5 – Determinação da atividade Enzimática	21
4.6 – Produção de Galactooligossacarídeo	22
4.7 – Efeito da concentração da enzima na síntese de GOS	22

4.8 – Efeito da temperatura na síntese de Galactooligossacarídeo	23
4.9 – Efeito do tempo de reação na síntese de Galactooligossacarídeo	23
4.10 – Análise dos produtos formados	23
4.10.1– Cromatografia em papel	23
4.10.2– Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	24
5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
5.1 – Produção de β -galactosidase	25
5.1.1 – Preparação do extrato semi-purificado	26
5.2 – Produção de Galactooligossacarídeo	26
5.2.1 – Efeito da concentração da lactose na síntese de Galactooligossacarídeo	26
5.2.2 – Efeito da concentração da enzima na síntese de Galactooligossacarídeo	29
5.2.3 – Efeito da temperatura na síntese de Galactooligossacarídeo	32
5.2.4 – Efeito do tempo de reação na síntese de Galactooligossacarídeo	33
5.3 – Avaliação da Produção de Galactooligossacarídeo	36
5.3.1 – Cromatografia em papel	36
5.3.2 – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	38
6 – CONCLUSÕES	47
7 – PERSPECTIVAS FUTURAS	49
8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50

Tabela 1: FOSHU Alimentos/Ingredientes	3
Tabela 2: Alguns tipos de Oligossacarídeos (NAKAKUKI, 2002).	6
Tabela 3: Propriedades dos Oligossacarídeos (NAKAKUKI, 2002).	7
Tabela 4: Importância fisiológica e benefícios à saúde obtidos pelos NDOs	8
Figura 1: Demanda dos Oligossacarídeos no Japão.	9
Figura 2: Produção de β -galactosidase a partir de <i>Scopulariopsis</i> .	25
Figura 3: Efeito da concentração de lactose na produção de Galactooligossacarídeo	27
Figura 4: Efeito na concentração de lactose comparando na produção de Galactooligossacarídeo.	29
Figura 5: Efeito da concentração de β -galactosidase e do tempo de reação na síntese de Galactooligossacarídeo.	31
Figura 6: Efeito na concentração de β -galactosidase na produção de 4'galactosil-lactose, glicose, galactose a partir da solução de lactose 40% (p/v), pH 5.0 e 48 horas de reação.	31
Figura 7: Produção de 4'galactosil-lactose, a 45°C, a partir da solução de lactose 40% (p/v), pH 5.0.	32
Figura 8: Produção de Galactooligossacarídeo em relação ao tempo de reação, utilizando lactose 40%, pH 5.0 e 10 U/mL de β -galactosidase de <i>Scopulariopsis</i> sp.	34
Figura 9: Produção de Galactooligossacarídeo em relação ao tempo de reação, utilizando lactose 40%, pH 4.5 e 10 U/mL de β -galactosidase de <i>Aspergillus oryzae</i> .	35
Figura 10: Cromatografia em papel, utilizando, 10, 25 e 40% de lactose, pH 5.0, 10U/mL de β -galactosidase de <i>Scopulariopsis</i> , durante 12h de reação.	37
Figura 11: Cromatografia em papel, utilizando, 10, 25 e 40% de Lactose, pH 5.0, 10U/mL de β -galactosidase de <i>Scopulariopsis</i> , durante 24h(a) e 36h(b) de reação.	38

Figura 12: Perfil cromatográfico da mistura de carboidrato por CLAE. Amostra de açúcares obtida após conversão da lactose 40% (p/v) em GOS, utilizando-se 10U/mL de β -galactosidase de <i>Scopulariopsis</i> sp, em 12 horas de reação em pH 5.0 à 45°C.	41
Figura 13: Perfil cromatográfico da mistura de carboidrato por CLAE. Amostra de açúcares obtida após conversão da lactose 40% (p/v) em GOS, utilizando-se 10U/mL de β -galactosidase de <i>Aspergillus oryzae</i> , em 12 horas de reação em pH 4.5 à 45°C.	41
Figura 14: Perfil cromatográfico da mistura de carboidrato por CLAE. Amostra de açúcares obtida após conversão da lactose 40% (p/v) em GOS, utilizando-se 10U/mL de β -galactosidase de <i>Scopulariopsis</i> sp, em 24 horas de reação em pH 5.0 à 45°C.	42
Figura 15: Perfil cromatográfico da mistura de carboidrato por CLAE. Amostra de açúcares obtida após conversão da lactose 40% (p/v) em GOS, utilizando-se 10U/mL de β -galactosidase de <i>Aspergillus oryzae</i> , em 24 horas de reação em pH 4.5 à 45°C.	42
Figura 16: Perfil cromatográfico da mistura de carboidrato por CLAE. Amostra de açúcares obtida após conversão da lactose 40% (p/v) em GOS, utilizando-se 10U/mL de β -galactosidase de <i>Scopulariopsis</i> sp, em 48 horas de reação em pH 5.0 à 45°C.	43
Figura 17: Perfil cromatográfico da mistura de carboidrato por CLAE. Amostra de açúcares obtida após conversão da lactose 40% (p/v) em GOS, utilizando-se 10U/mL de β -galactosidase de <i>Aspergillus oryzae</i> , em 48 horas de reação em pH 4.5 à 45°C	43
Figura 18: Perfil cromatográfico da mistura de carboidrato por CLAE. Amostra de açúcares obtida após conversão da lactose 40% (p/v) em GOS, utilizando-se 190U/mL de β -galactosidase de <i>Aspergillus oryzae</i> , em 12 horas de reação em pH 4.5 à 45°C	44
Figura 19: Perfil cromatográfico da mistura de carboidrato por CLAE. Amostra de açúcares obtida após conversão da lactose 40% (p/v) em GOS, utilizando-se 190U/mL de β -galactosidase de <i>Aspergillus oryzae</i> , em 24 horas de reação em pH 4.5 à 45°C	44
Figura 20: Perfil cromatográfico da mistura de carboidrato por CLAE. Amostra de açúcares obtida após conversão da lactose 40% (p/v) em GOS, utilizando-se 190U/mL de β -galactosidase de <i>Aspergillus oryzae</i> , em 48 horas de reação em pH 4.5 à 45°C	45
Figura 21: Cinética de produção de 4'galactosil-lactose em relação ao tempo, utilizando lactose 40% (p/v) em pH 5.0 e 10U/mL de β -galactosidase de <i>Scopulariopsis</i> sp e <i>Aspergillus oryzae</i> .	46

RESUMO

Os galactooligossacarídeos (GOS), um grupo de oligossacarídeos, são carboidratos não digeríveis (NDOs), resistentes à hidrólise das enzimas digestivas do intestino, tem os efeitos fisiológicos similares ao da fibra dietética. Sua ingestão aumenta a proliferação das *Bifidobacterium* e dos *Lactobacilus* no intestino. Eles são considerados como ingredientes prebióticos.

Devido aos possíveis benefícios à saúde, associados com o consumo destes compostos, seu uso como Alimento Funcional tem crescido rapidamente, particularmente no Japão e Europa.

Este trabalho teve como objetivo a extração da enzima β -galactosidase a partir do microrganismo *Scopulariopsis* sp, de avaliar o efeito da temperatura, tempo de reação, concentração de enzima e lactose, de modo a obter condições mais eficientes para a produção de GOS, além disso, comparar esses resultados com os GOS produzidos com a enzima comercial obtida por *Aspergillus oryzae*. Como resultado, observamos que a linhagem de *Scopulariopsis* sp sintetizou grandes quantidades de β -galactosidase por fermentação semi-sólida, que foi produzida constitutivamente. A enzima semi-purificada foi precipitada de etanol 70%. O extrato foi caracterizado bioquimicamente, mostrando ter pH ótimo de 5,0 e a melhor temperatura a 45°C, para atividade de transgalactosilação.

A enzima obtida a partir de *Scopulariopsis* sp converteu 20% de lactose em oligossacarídeos (80.8mg/mL de 4'galactosyl-lactose), comparando com a β -galactosidase de *Aspergillus oryzae*, que converteu 6% de lactose em

oligossacarídeos (25.6mg/mL de 4'galactosyl-lactose), utilizando lactose 40% (p/v), à 45°C, pH 5.0 e 10U/mL e o melhor tempo foi o de 12h de reação.

Também houve a produção de outro galactooligossacarídeo de estrutura não identificada ainda, sendo necessário estudos adicionais que elucidem a estrutura e atividade destes GOS.

ABSTRACT

The galactooligosaccharides (GOS), a group of oligosaccharide, are not digerable carbohydrates (NDOs), they are resistant to hydrolysis by digestive enzymes from intestine and have similar dietary fiber physiological effect. Its ingestion increases the *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* proliferation in the intestine. They are considered prebiotic ingredients.

Due to the possible health benefits associated with the consumption of these compounds, their use as functional ingredients has grown quickly, particularly in Japan and Europe.

The aim of this work was to extract the β -galactosidase from *Scopulariopsis* sp, and to evaluate the temperature conditions, reaction time, lactose and enzyme concentration, to improve the GOS production, beyond that, to make a comparison with the GOS obtained by commercial enzyme produced by *Aspergillus oryzae*.

As result the *Scopulariopsis* sp strain had, accumulated great amounts of β -galactosidase on semisolid fermentation and the enzyme was produced continuously. The enzyme solution was precipitated by using 70% ethanol. The extract was biochemically characterized showing the optimum pH of 5.0, and the best temperature was 45°C, for transgalactosylation activity.

The enzyme isolated from *Scopulariopsis* sp has converted 20% of lactose into oligosaccharides (80.8mg/mL of 4'galactosyl-lactose), comparing with β -galactosidase from *Aspergillus oryzae*, a commercial enzyme, that converted 6% of lactose into oligosaccharides (25.6 mg/mL of 4'galactosyl-lactose), using lactose 40% (p/v), at 45°C, pH 5.0 and 10U/mL, and the best reaction time was at 12h of reaction.

We also observed the production of other galactooligosaccharide with non-identified structure, been necessary additional research to discover their structure and activity.

1 – INTRODUÇÃO

Oligossacarídeos e seus derivados são biomoléculas, que tem uma escala de funções importantes nos sistemas biológicos. Eles são bifidogênicos e também ajudam na: (i) redução do nível de colesterol sérico; (ii) síntese de vitaminas do complexo B; (iii) ajuda na absorção do cálcio da dieta (GAUR et al., 2005).

Os galactooligossacarídeos (GOS) é um grupo de oligossacarídeos, compostos por moléculas de galactose ligada à lactose, sendo formados de tri a hexassacarídeos com 2-5 unidades de galactose (SAKO, MATSUMOTO e TANAKA, 1999).

Os GOS são carboidratos não digeríveis, sendo resistentes às enzimas digestivas e fermentados por bifidobactérias. Os benefícios da ingestão de galactooligossacarídeos são o aumento da população de bifidobactérias no cólon e por efeito antagônico, supressão da atividade de bactérias putrefativas reduzindo a formação de metabólitos tóxicos (TOMOMATSU, 1994), e produção de ácidos graxos de cadeia curta (ISHIKAWA et al., 2005). Também tem sido demonstrado que a ingestão de GOS aumenta a absorção de cálcio (BROUNS e VERMEER, 2000). GOS são produzidos a partir da lactose por ação da β -galactosidase, comumente chamada de lactase. Quando esta se encontra em baixa concentração, ocorre sua hidrólise, enquanto que os GOS são sintetizados em alta concentração de lactose por atividade de transgalactosilação (TOMOMATSU, 1994).

A importância industrial da β -galactosidase está em sua aplicação na indústria de laticínios. Esta enzima hidrolisa a lactose, carboidrato característico

do leite e conhecido popularmente como “açúcar do leite”, em seus monossacarídeos glicose e galactose, obtendo assim, alimentos com baixos teores de lactose, melhorando a solubilidade e digestibilidade do leite e derivados lácteos, ideais para consumidores intolerantes à lactose (SANTIAGO et al., 2004).

Além disso, os GOS não são cariogênicos, possuem baixos valores calóricos e diminuem a taxa glicêmica do sangue. Outro fator importante é que esses açúcares estão sendo aplicados em produtos industrializados também por suas variadas características físico-químicas, adequadas quando processados em alimentos. Em particular, os GOS possuem alta estabilidade em condições variadas de acidez e altas temperaturas, possibilitando a aplicação do mesmo em larga variedade de produtos, sem que haja decomposição (SAKO, MATSUMOTO, TANAKA, 1999).

Recentemente, um dos desenvolvimentos mais significativos na ciência, é o de alimentos funcionais, relacionados ao desenvolvimento dos suplementos dietéticos que afetam benéficamente a composição microbiota do intestino. A regulação da microflora intestinal melhora o bem estar das pessoas, administrado pelos probióticos e o prebióticos, atraindo atenção cada vez maior de pesquisadores, indústrias e os próprios consumidores. GOS são considerados prebióticos. (CHOCKCHAIWASDEE et al., 2005).

2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 PRE E PROBIÓTICOS

Em 1991 o governo japonês criou o termo FOSHU (Food for Specified Health Use) para os alimentos funcionais, estando listados entre eles fruto- e galactooligossacarídeos. Atualmente, a lista FOSHU compreende um total de 69 alimentos aprovados e entre estes, 34 incorporavam oligossacarídeos em sua fórmulação. Os oligossacarídeos são geralmente definidos como glicosídeos que contém entre três e dez monossacarídeos, entretanto muitos dissacarídeos apresentam propriedades similares (CRITTENDEN e PLAYNE, 1996).

Os alimentos ou ingredientes que são adequados à legislação FOSHU podem ser classificados dentro das categorias dos carboidratos, das proteínas, dos minerais, etc. como mostrado na Tabela 1. Os carboidratos estão em grande parte, como o maior grupo destes alimentos.

CARBOIDRATOS	PROTEINAS
Polidextrose dextrina indigerível <u>galactooligossacarídeos</u> lactulose lactosacarose isomalto-oligossacarídeo maltitol palatinose oligossacarídeos de soja frutooligossacarídeos xilo-oligossacarídeos farelo de trigo	caseína fosfo peptídeo caseína dodecapeptide proteína de soja
	MINERAIS
	fósforo cálcio ferro
	OUTROS
	globulina do arroz <i>Lactobacillus GG</i>

O estabelecimento de bifidobactérias na microflora intestinal de lactentes tem sido atribuído à presença de oligossacarídeos contendo galactose em leite humano. Assim a inclusão de GOS como ingrediente prebiótico tem tido considerável interesse comercial e várias empresas estão envolvidas com a sua produção.

Os prebióticos são considerados alimentos não digeríveis (NDO) que beneficiam o hospedeiro por estimular seletivamente o crescimento e/ou a atividade das bactérias “benéficas”, resistentes no cólon intestinal, tais como os gêneros *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*, tendo efeito antagônico, diminuindo os compostos tóxicos dos grupos menos desejáveis tais como *Clostridia* (CHOCKCHAIWASDEE et al., 2005).

Os probióticos são suplementos alimentares contendo microrganismos vivos que beneficiam o hospedeiro por melhorar seu equilíbrio intestinal. Os mais conhecidos são as bactérias lácteas e bifidobactérias, que são largamente usados em iogurtes e outros derivados do leite. Esses organismos não são patógenos, nem toxinogênicos, devem sobreviver ao processo de armazenamento e à passagem pelo estômago e intestino delgado (CRITTENDEN e PLAYNE, 1996).

O carboidrato é a fonte de energia preferida dos microrganismos intestinais; entretanto, na ausência de carboidratos, alguns grupos como os *Clostrídios*, por exemplo, utilizam as proteínas, e sua fermentação produz metabólitos nitrogenados prejudiciais no lúmen (e.g. aminas biogênicas e amônia), a putrefação crônica pode aumentar o risco do câncer de cólon, com a alta produção de amônia, que pode conduzir ao crescimento neoplásico do epitélio do cólon, os fenóis podem agir como co-carcinogênico. (OUWEHAND et al., 2005)

2.2 OLIGOSSACARÍDEOS

Os oligossacarídeos 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 atividade fisiológica, sendo assim denominados de Alimento Funcional (NAKANO, 1998).

O termo "oligossacarídeo" corresponde a uma ligação curta de moléculas de açúcar ("oligo" significa "pouco" e "sacarídeo" significa "açúcar"), os fructoooligosacarídeos (FOS) e a inulina, encontrados em muitos vegetais, consistem em ligações curtas de moléculas de frutose. O GOS, que também é um açúcar natural, consiste em ligações curtas de moléculas de galactose. Estes compostos podem ser parcialmente digeridos pelo homem. Quando os oligossacarídeos são consumidos, eles servem como o alimento para os probióticos, tais como os gêneros *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* (VAN DOKKUM et al., 1999).

Os oligossacarídeos são classificados como alimentos não digeríveis (NDOs), as propriedades de dispersibilidade e a capacidade de retenção de água dos NDOs, determinam a habilidade das bactérias penetrarem no bolo alimentar e degradarem a fibra. Dessa forma, os NDOs com maior capacidade de reterem água (fibra alimentar solúvel e amido resistente) geralmente são mais facilmente fermentados do que aqueles com menor capacidade de reter água (fibra alimentar insolúvel), estando os GOS classificados em substâncias semelhantes às fibras hidrossolúveis em sua maioria (ALMEIDA e PASTORE, 2001).

A pesquisa sobre a produção dos oligossacarídeos para aplicação em alimentos teve início em torno de 1970 a 1975 no Japão, e diversos oligossacarídeos, tais como oligossacarídeos relacionados a amido, sacarose e lactose estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2. Alguns tipos de oligossacarídeos.

Material cru	Produto
Amido	Malto-oligossacarídeos: maltose Isomalto-oligossacarídeos: isomaltose, panose, isomaltotriose Ciclodextrinas (CDs): α -CD, β -CD, γ -CD Outros: maltitol, gentio-oligossacarídeos
Sacarose	Glicosilsacarose, fruto-oligossacarídeos, palatinose (isomaltulose), lactosacarose, xilosacarose, rafinose.
Lactose	Galactooligossacarídeos, lactosacarose, lactulose, lactitol.
Xilana, goma guar, manana, quitina, quitosana	Xilo-oligossacarídeos, agaro-oligossacarídeos, mano-oligossacarídeos, quitina/quitosana oligossacarídeos, etc.

(NAKAKUKI, 2002)

A indústria vem explorando cada vez mais as propriedades dos oligossacarídeos, devido às suas propriedades físicas e fisiológicas descritas na Tabela 3. Devido a essas propriedades, os oligossacarídeos são extensamente utilizados em alimentos, bebidas, como iogurtes, bebida láctea e em produtos de confeitaria. Muitos oligossacarídeos não são digeridos por humanos (TOMOMATSU, 1994), sendo então usados em alimentos dietéticos para serem consumidos por diabéticos. No caso de alimentos doces, eles também podem ser

usados como matriz em conjunto com adoçantes artificiais, como aspartame e fenilalanina, mascarando o sabor indesejável produzido por alguns desses adoçantes.

Tabela 3. Propriedades dos Oligossacarídeos

Propriedades Físicas	Doçura, amargor, higroscopicidade, atividade de água, agente espessante para bebidas, estabilização das substâncias ativas (proteína, sabor, cor, etc.), etc.
Propriedades Fisiológicas	Alimento não digerível, anticariogênico, ação bacteriostática, proliferação seletiva de <i>Bifidobacterium</i> , melhoria de níveis de colesterol sérico e glicemia, etc

NAKAKUKI, 2002.

O principal interesse do uso dos oligossacarídeos como ingrediente dos alimentos se deve às suas propriedades físicas, além de apresentarem vantajosas características físico-químicas. Ao contrário do amido e dos monossacarídeos, os oligossacarídeos não são utilizados pela microflora bucal para formar ácidos e poliglucanas, conseqüentemente são usados como açúcares de baixa cariogenicidade em confeitos, gomas de mascar, iogurtes e bebidas.

Um maior detalhamento da importância fisiológica e de alguns efeitos benéficos à saúde, dos NDOs estão descritos na Tabela 4.

Tabela 4. Importância fisiológica e benefícios a saúde obtido pelos NDOs.

Efeito fisiológico	Fatores da saúde
O Metabolismo de carboidratos no intestino é estimulado pela colônia de bactérias; aumenta as bifidobactérias e ácidos graxos de cadeia curta	Através dos ácidos graxos de cadeia curta, fornecem fonte de energia para o epitélio. A flatulência pode ser um problema. Efeito laxativo.
Seleção do crescimento bacteriano e produção ácido láctico no intestino grosso.	Maior resistência a invasão de microrganismos patogênicos.
Não hidrolisado por microrganismos orais.	Proteção contra à cárie
Não glicêmico	Potencialidade para uso de diabéticos
Estimulação não-específica da função imune	Resistência a infecção
Modulação do metabolismo carcinogênico	Propriedades anti-câncer
Síntese hepática reduzida de Triglicerídeos, colesterol e lipoproteínas de baixa densidade.	Proteção a doenças coronárias
Aumenta a absorção de Mg e Ca	Potencialidade para diminuir o risco de osteoporose

MACFARLANE e CUMMINGS, 1999

A demanda para oligossacarídeos no Japão é mostrada na Figura 1. Atualmente, o mercado para oligossacarídeos estima-se ser de aproximadamente 2 bilhões dólares/ano.

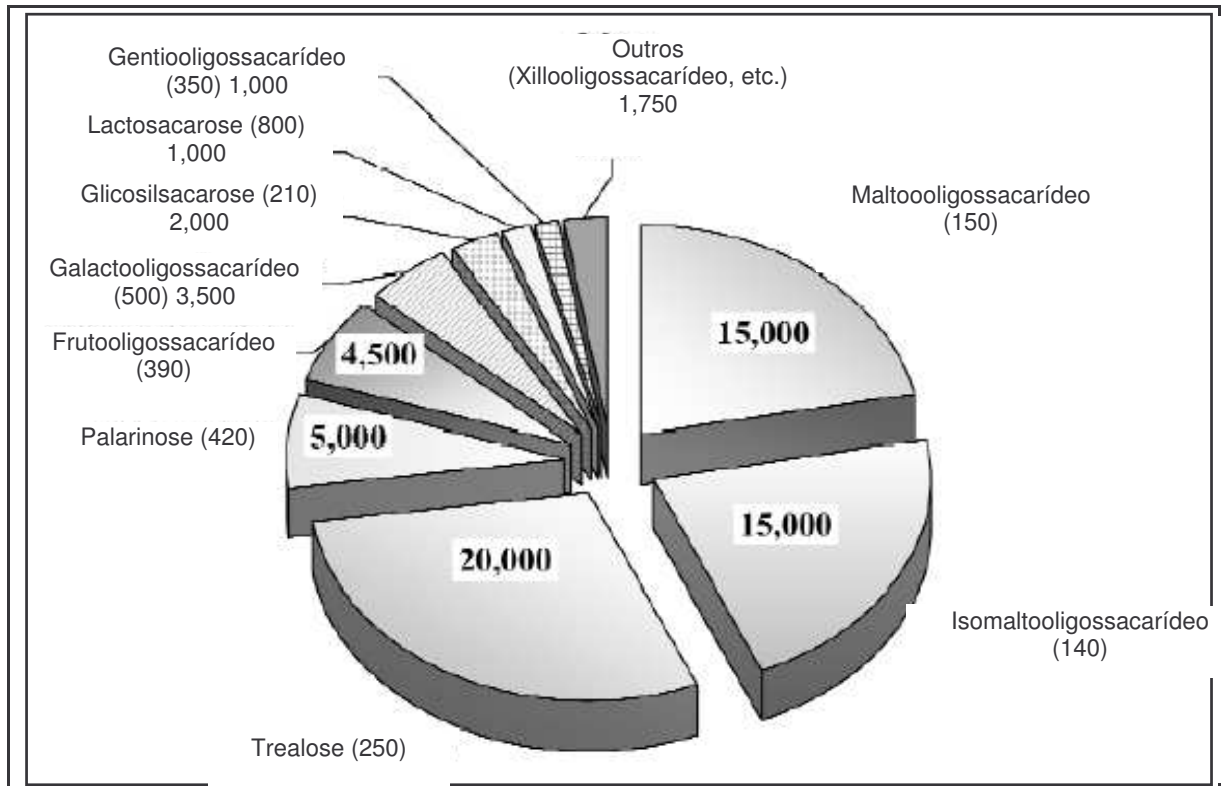


Figura 1 – Demanda dos oligossacarídeos no Japão (tonelada/ano).
() preço médio por quilograma de cada produto.
Nakakuki, 2002.

O mercado para oligossacarídeos já é substancial e continua a expandir gradualmente. Dentre os mercados, a quantidade da produção de oligossacarídeo do amido alcança o nível mais elevado. Das empresas atuais, as japonesas dominam a produção mundial de oligossacarídeos, como mostram as pesquisas e desenvolvimento. Entretanto, alguns itens permanecem para serem resolvidos: O primeiro problema é a necessidade de estabelecer uma produção contínua e eficiente do xarope dos oligossacarídeos. Em segundo, os oligossacarídeos fisiologicamente funcionais necessitam ser projetados, com um sistema de

avaliação das propriedades funcionais bem estabelecido. Resolvido este desafio, o mercado para oligossacarídeos progredirá mais rapidamente (NAKAKUKI, 2002).

Com a preocupação cada vez maior dos consumidores em adquirir alimentos saudáveis, alimentos fisiologicamente funcionais, o futuro para os produtos que contêm oligossacarídeos parece extremamente atraente. Estes oligossacarídeos funcionais podem desempenhar um papel importante para a redução de doenças no futuro próximo e a melhoria da saúde humana.

2.3 GALACTOOLIGOSSACARÍDEOS E β -GALACTOSIDASE

ONISHI, KIRA, YOKOZEKI, 1996. pesquisaram a produção de GOS a partir da levedura, *Sirobasidium magnum* CBS 6803, e verificaram que a produção de GOS aumentou com relação ao tempo. Os autores obtiveram 136mg/mL de GOS, compreendido de 124mg/mL de trissacarídeos e 12mg/mL de tetrassacarídeos, formados depois de um período de incubação de 42h. Verificaram também que os pentassacarídeos e os oligossacarídeos maiores foram formados somente em algumas amostras. Uma quantidade considerável de glicose foi produzida, mas pouca galactose foi formada. Após a adição de tolueno tratado com glicose oxidase, para a retirada da glicose, que inibe a produção de GOS, verificou-se que a quantidade de GOS produzido foi de 224mg/mL, incluindo 180mg/mL de trissacarídeos e 44mg/mL de tetrassacarídeo. A produtividade de GOS aumentou consideravelmente, demonstrando que esta combinação foi bastante favorável.

Nos GOS produzidos a partir da lactose, a ligação entre as unidades de galactose, a eficiência da transgalactosilação e os componentes dos produtos

finais dependem da enzima e das condições empregadas na reação. As ligações glicosídicas entre as unidades de galactose geralmente são β -1,4 ou β -1,6 dependendo de qual microrganismo a β -galactosidase foi produzida. Embora sejam formados de tri a hexassacarídeos com 2 a 5 unidades de galactose, é muito comum encontrar dissacarídeos transgalactosilados, constituído de galactose e glicose com ligações β -glicosídicas diferentes de lactose ou com duas unidades de galactose, estes dissacarídeos são considerados NDOs (alimento não digerível) desde que tenham características fisiológicas similares a dos GOS (SAKO et al., 1999).

Os GOS são preconizados como GRAS (Generally Recognized as Safe) por serem componentes do leite humano e tradicionalmente de iogurtes, sendo produzidos no intestino por bactérias, fungos ou leveduras produtoras de β -galactosidase a partir de lactose ingerida. São naturalmente encontrados na soja, não apresentam toxicidade, somente a diarreia é conhecida como efeito adverso quando os GOS são consumidos em excesso, sendo a dose estimada em 0,3-0,4 g/Kg de peso corpóreo (SAKO et al., 1999).

Segundo CARABIN et al. (1999), a ingestão diária média de oligossacarídeos por pessoa nos Estados Unidos é estimada ser aproximadamente 800 a 1000mg/dia. Para melhorar a flora bacteriana, a recomendação usual para o FOS, o GOS, ou inulina são 2000 a 3000/mg/dia. No caso de pessoas com diabetes e índice elevado de gordura no sangue (colesterol e triglicerídeos), as quantidades variaram de 8 a 20g/dia. Geralmente, os oligossacarídeos são bem tolerados, em alguns casos foram relatados flatulência

aumentada. Em níveis mais elevados de ingestão, isto é, um excesso de 40g/dia, GOS e os outros oligossacarídeos podem induzir a diarreia.

KAJIWARA, GANDHI, USTUNOL, (2002) testaram cinco tipos de bifidobactérias intestinais do ser humano, *B. longum*, *B. adolescentis*, *B. breve*, *B. bifidum*, e *B. infantis*, os quais foram cultivados no meio clostridial reforçado (controle) e no meio clostridial reforçado suplementado com 5% (p/v) de mel, ou fructooligosacarídeo (FOS), ou galactooligosacarídeo (GOS), e a inulina. As amostras inoculadas foram incubadas anaerobicamente a 37°C por 48h. Os níveis de produtos de fermentação tais como ácidos láctico e acético, foram medidos por cromatografia líquida de alta eficiência. O mel ocasionou o crescimento das cinco culturas bem como FOS, GOS e a inulina. O mel, o FOS, o GOS e a inulina foram eficazes ($p<0,05$) em sustentar o crescimento destas culturas, após 24h de incubação, em comparação ao tratamento controle.

ALMEIDA (2003), estudou a produção de GOS por β -galactosidase de *Scopulariopsis sp.* Este fungo encontrado do solo, foi o maior produtor de β -galactosidase, entre os 1067 microrganismos estudados (PASTORE e PARK, 1979). Os pesquisadores avaliaram a influência da temperatura, efeito do pH, concentração da enzima e síntese de galactooligosacarídeos. Foi usado uma concentração de lactose a 40% (p/v), em tampão acetato de sódio 0,1 M pH 4.5 a 45°C, incubada com 6U/mL de β -galactosidase, a enzima converteu 30% da lactose em oligossacarídeos (224,92 mg/mL de 4'galactosil lactose).

Sabe-se que diversas leveduras e fungos basidiomicetos têm potente atividade de transgalactosilação e eficiente produção de GOS por *Sporobolomyces singularis* (CRITTENDEN, PLAYNE, 1996. e ISHIKAWA, et al.,

2005), *Sterigmatomyces eliviae* (NAKAKUKI, 2002), *Aspergillus oryzae* (HSU, YU, CHOU, 2005), *Scopulariopsis* sp (ALMEIDA e PASTORE, 2001; PASTORE e PARK 1979).

A enzima β -galactosidase (EC 3.2.23) é uma enzima comercialmente importante. Ela catalisa a hidrólise de β -galactopiranosídeos, tais como a lactose, hidrolisando a lactose com a β -galactosidase, com isso, os problemas associados com a eliminação do soro, cristalização de lactose em certos alimentos congelados e o consumo de leite por indivíduos com intolerância a lactose podem ser aliviados. Além de catalisar a conversão da lactose a glicose e galactose, a β -galactosidase catalisa também a reação de transgalactosilação; a lactose serve como doador de unidades de galactosil e um aceptor para a fórmula di-, tri e outros GOS mais elevados (HSU et al., 2005).

As técnicas de metagenômica vêm alcançando grande interesse na pesquisa de alimentos. Os pesquisadores ISHIKAWA et al., (2005) estudaram a produção de β -galactosidase de *Sporobolomyces singularis* para a produção de GOS. Sabendo-se que a produção de GOS é inibida pela presença de glicose, os pesquisadores isolaram um gene mutante do *S. singularis*, resistente à glicose e verificou-se que a atividade da enzima do fungo mutante era 10 vezes mais ativa que a enzima mãe.

CHOCKCHAIASAWASDEE et al., (2005) realizaram um estudo da síntese de GOS a partir de *Kluyveromyces lactis*, em relação à concentração de lactose e concentração da enzima. Os resultados mostraram que a quantidade de GOS formada dependeu da concentração da lactose, mas não da concentração da

enzima. O melhor desempenho da produção de GOS foi obtido na temperatura de 40°C e pH 7.

GAUR et al. (2005) estudaram a síntese de GOS por um método apropriado de imobilização de β -galactosidase de *Aspergillus oryzae*. A avaliação comparativa das três principais técnicas de imobilização (adsorção, acoplamento covalente de quitosana e agregação de enzima cross-linked – CLEA) de β -galactosidase por *Aspergillus oryzae* foi estudada. Estas técnicas foram comparadas em termos de rendimento da preparação do imobilizado, característica enzimática, estabilidade e eficiência na síntese de oligossacarídeos. Usando 20% (p/v) de lactose, a enzima imobilizada em quitosana obteve rendimento máximo de oligossacarídeos (17,3% de açúcar total) quando comparado da enzima livre (10%) em 2h a 40°C. CLEA foi escolhido pela eficiência da hidrólise de lactose que obteve 78% de monossacarídeos em 12h.

Com base nestas descobertas, o desenvolvimento de um método de produção de GOS eficiente e barato é altamente desejável. Assim, esta revisão demonstra que pesquisadores de diversos países têm se preocupado em buscar microrganismos capazes de produzir β -galactosidase, com alta atividade de transgalactosilação para a produção de GOS. Sendo já reconhecido que dietas com estes oligossacarídeos propiciam um bem estar para o indivíduo, esta linha de pesquisa é bastante promissora, e no momento, está em plena expansão.

2.4 BENEFÍCIOS DOS GALACTOOLIGOSSACARÍDEOS

REDDY (1999) desenvolveu um estudo que usava como substrato oligossacarídeos e inulina, obtidos da chicória, com o objetivo de relacionar a ação destes prebióticos, com a atividade inibitória do câncer de cólon em animais. Os resultados deste estudo indicaram que a administração dietética de oligofrutose e de inulina inibiu o crescimento dos tumores em animais. O grau de inibição foi maior nos animais que se alimentaram de inulina do que os se alimentaram de oligofrutose, devido ao estímulo de *Bifidobacterium* intestinais como *Bifidobacterium logum*. A inibição carcinogênica foi associada a diminuição de metabólitos tóxicos. Experimentações clínicas associadas aos efeitos anti-câncer, precisam ser aprimorados e cuidadosamente estudados.

CHIM, et al. (1999) acompanharam um estudo com 12 adolescentes masculinos saudáveis, de 14-16 anos. O objetivo deste estudo foi de investigar se 15g/dia de oligofrutose estimulavam a absorção de cálcio. Um grupo de adolescentes receberam oligofrutose e outro grupo receberam sacarose (grupo controle) nas três principais refeições do dia. O tratamento foi controlado analisando-se amostras de sangue e urina. Um aumento na absorção de cálcio foi encontrado após o consumo deste oligossacarídeo (diferença de 10.8 ± 5.6 , $P < 0,05$ do início). Esses pesquisadores constataram que 15g/dia de oligofrutose estimulou a absorção de cálcio nos adolescentes masculinos.

Recentemente muitos tipos dos oligossacarídeos têm sido desenvolvidos para serem usados como substitutos do açúcar, devido às vantagens à saúde, quando comparados aos edulcorantes artificiais. Alguns pesquisadores, OKU e

NAKAMURA (2002), estudaram um substituto do açúcar que não seja digerido e absorvido no intestino e que alcance o cólon, onde são fermentados completamente por bactérias intestinais produzindo ácidos graxos de cadeia curta que são convertidos em energia. A energia disponível de um substituto de um açúcar não digerível, é estimada em aproximadamente 2 kcal/g. Uma ingestão elevada de alimentos não digeríveis (NDOs), como por exemplo, os frutooligossacarídeos, inulina, galactooligossacarídeos, podem causar diarreia e flatulência em animais e humanos. Entretanto, esses sintomas desaparecem em poucos dias, pois o número de bactérias intestinais é aumentado.

A dose recomendada, para que não ocorra diarreia com a ingestão de oligossacarídeos é estimado em aproximadamente 0,3g/Kg corpóreo, dados baseado em estudos com japoneses adultos, embora esse valor seja variado, dependendo de vários fatores como estilo de vida, hábito alimentar, casos de doenças cardíacas, diabetes, colesterol sérico, etc. O objetivo de substituir esses açúcares, está associado aos efeitos benéficos e também algumas funções fisiológicas como:

- Conservar a secreção de insulina no pâncreas;
- Melhorar a microflora intestinal;
- Não ser cariogênico;
- Efeito an-ticâncer
- Estimular a absorção de minerais (Mg^{++} e Ca^{++}).

A comparação do efeito de vários prebióticos tem estimulado pesquisas que analisam seus benefícios em conjunto. MORO, et al., (2002) estudaram oligossacarídeos do leite humano, acrescentado em fórmulas infantis, para

estimular o crescimento de *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*. O efeito de uma mistura de dois prebióticos, os frutooligossacarídeos (FOS) e galactooligossacarídeos (GOS), foi analisado em 90 crianças. Amostras fecais foram coletadas para contagem das Unidades Formadoras de Colônias (UFC), e a influência do pH. Várias doses e tempos foram testados, com o objetivo de verificar as condições mais adequadas. A dose de 0,8g/Kg corpóreo de GOS, foi a mais adequada em relação a fórmula placebo (a base de maltodextrina). A mistura de GOS e FOS teve efeito estimulante no crescimento de *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*, no intestino, sendo bastante promissora para o uso de suplementos para fórmulas infantis.

GOS são resistentes à hidrólise das enzimas digestivas do intestino e tem os efeitos fisiológicos similares ao da fibra dietética hidrossolúvel. A ingestão destes oligossacarídeos aumenta a proliferação das *Bifidobacterium* e dos *Lactobacillus* no intestino, que são considerados benéficos à saúde humana. A popularidade e a aplicação do GOS como alimentos funcionais (fator bifidogênico em fórmulas de produtos infantis), estão aumentando. Um outro benefício é que a transformação da lactose em oligossacarídeos resulta produtos com baixo teor de lactose. Sabe-se bem que mais e mais pessoas no mundo sofrem com problemas gastrointestinais por causa do índice elevado de lactose nos produtos lácteos, chamado intolerância à lactose. A busca para sua solução começou por volta de 1970 e continua nos dias de hoje. Nos últimos 30 anos muitos produtos ricos em lactose foram investigados, iogurtes, manteiga, queijo caseiro, leite desnatado, leite fermentado, bebida láctea, leite em pó, sobremesa ou sorvetes (CURDA et al., 2005).

Recentemente, PÉREZ-CONESA et al. (2006) estudaram sete grupos de ratos, que foram alimentados durante um mês, onde um grupo recebeu uma fórmula infantil contendo *Bifidobacterium bifidum* e *Bifidobacterium longum*, os três grupos receberam fórmulas infantis contendo 4'galactosil-lactose (GOS) a 1,2%, 5,0%, e 10,0%, e 3 fórmulas infantis contendo ambos ingredientes. Amostras fecais foram coletadas para contagem de microrganismos aeróbicos totais, anaeróbicos totais e *Bifidobacterium*, durante três períodos: 8–10, 18–20 e 28–30 dias. Resultados mostraram que as bifidobactérias representaram uma importante proporção em relação ao grupo de anaeróbicos no 1º período. No 2º período as bifidobactérias diminuíram significativamente, e no 3º período a contagem de bifidobactérias aumentou, especialmente no grupo alimentado com a dieta contendo GOS 1,2%.

Em um 2º estudo, 12 crianças foram alimentadas com a fórmula infantil contendo *B. bifidum* and *B. longum*, e outras 12 crianças foram alimentadas com a fórmula infantil controle. Amostras fecais foram coletadas nas idades de 1, 3, 5, 7, 9, e 12 meses para contagem de anaeróbicos totais, *Bifidobacterium*, *Clostridios*. Em todas as amostras foi medido o pH. Crianças de 7 a 9 meses, alimentadas com a fórmula infantil contendo bifidobactéria, apresentaram contagens significativamente mais elevadas de bifidobactéria ($P < 0.05$) e um pH fecal mais baixo, quando comparado ao grupo de crianças alimentadas com a fórmula infantil controle.

3. OBJETIVOS

- Produção da enzima lactase a partir do microrganismo *Scopulariopsis sp*, por fermentação semi-sólida (Processo Koji);
- Produção de galactooligossacarídeo utilizando o extrato bruto da enzima.
- Estudar o efeito da concentração de lactose, concentração enzimática, temperatura e tempo de reação, na produção de galactooligossacarídeo.
- Estudar comparativamente a produção de GOS por lactase de *Scopulariopsis sp* e *Aspergillus oryzae*.

4 – MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Microrganismo utilizado:

Como fonte da enzima β -galactosidase, foi utilizado o fungo *Scopulariopsis sp* isolado por PASTORE e PARK (1979), depositado na American Type Culture Collection (ATCC) sob o número 44206. Também foi utilizado uma lactase comercial, obtida pelo fungo *Aspergillus oryzae*, da SIGMA G-5160.

4.2 Produção do inóculo:

A preparação da suspensão de esporos foi realizada incubando-se a linhagem do fungo *Scopulariopsis sp*. Os microorganismos foram cultivados em tubo com meio PDA inclinado por 7 dias a 30°C. Após a incubação, foram adicionados a cada um dos tubos de cultivo 10mL de água destilada e estéril.

A superfície do meio de cultura foi levemente raspada com alça de platina estéril, para liberação dos esporos, até obtenção de uma suspensão de concentração celular igual a 10^8 esporos/mL (PASTORE, 1982).

4.3 Preparo do extrato enzimático

O fungo foi cultivado em fermentação semi-sólida em meio contendo farelo de trigo e água na proporção de 1:1 (p/v), a suspensão de esporos (10^8 esporos/mL) foi adicionada em frasco Erlenmeyer de 500mL, contendo 20g de substrato e esterilizado à 121°C por 20 minutos. Após incubação à 30°C por 7 dias foi adicionado 100 mL de água destilada. O meio foi meio triturado com bastão de vidro para liberação da enzima. A mistura ficou em repouso por 1 hora, em banho

de gelo. Após a filtração desse material, foi obtido o extrato enzimático bruto. (PASTORE 1982).

4.4 Precipitação com álcool etílico:

Para a obtenção da β -galactosidase adicionou-se ao filtrado, etanol resfriado a 8°C até concentração de 70%. Esse extrato alcoólico permaneceu em repouso a 5°C por 1 hora. Posteriormente foi centrifugado por 10 min. a 10.000 rpm, o precipitado contendo a enzima bruta foi liofilizado. A enzima bruta foi acondicionada em frascos adequados e congelada.

4.5 Determinação da atividade enzimática:

A atividade da β -galactosidase (EC 3.2.1.23 β -galactosídeo galactohidrolase) foi determinada usando o substrato sintético o-nitrofenil β -D-galactopiranosídeo (ONPG) como substrato (WALLENFELS e MALHOTRA, 1961).

O meio de reação corresponde a 1,55 ml de ONPG 0,25% em tampão acetato de sódio 0,1 M a pH 5,0; 0,15 mL de solução enzimática na concentração apropriada, sendo a mistura incubada a 60°C por 15 minutos. A reação foi paralisada com 0,15 mL de carbonato de sódio a 10%. O produto da reação enzimática é o cromóforo o-nitrofenol que tem cor amarela e foi medido espectrofotometricamente através de absorbância 420 nm. Uma unidade de atividade de β -galactosidase foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 μ mol de o-nitrofenol por minuto, nas condições de ensaio.

4.6 Produção de galactooligossacarídeo

A produção de galactooligossacarídeos foi realizada sob agitação constante, utilizando uma solução enzimática, a partir do extrato bruto, com concentração de 10U/mL em solução de lactose a 40% (p/v), preparada em tampão acetato de sódio 0,1M, pH 5,0. Essa mistura foi incubada a 45°C por 24 horas. Também foi testada a atuação da enzima em 12, 24 e 48 horas. A reação foi paralisada em banho fervente, a 100°C, por 10 minutos e as amostras foram analisadas qualitativamente por cromatografia em papel e quantitativamente por CLAE.

Visando ter um produto livre de impurezas e compostos coloridos, foi adicionado 2mg de carvão ativado para cada 100mL de solução de GOS. A solução foi mantida num recipiente livre de luz e depois filtrada com papel Whatman nº 1, utilizando o sistema a vácuo.

A solução de GOS foi concentrada, até 55° Brix em Evaporador rotativo, da Tecnal, à temperatura de 50°C. Essa concentração facilita sua manipulação e aplicação industrial, por ter viscosidade adequada e inibir o crescimento bacteriano.

4.7 Efeito da concentração da enzima na síntese de Galactooligossacarídeo

O efeito da concentração da enzima na conversão da lactose em galactooligossacarídeos foi avaliado utilizando-se concentrações de 0,5 a 10 U/mL de β -galactosidase, em solução de lactose a 40% em tampão acetato de sódio

0,1 M, pH 5,0. Em todos os experimentos a reação foi paralisada por inativação da enzima em banho de água em ebulição por 10 minutos.

4.8 Efeito da temperatura na síntese de Galactooligossacarídeo

O efeito da temperatura foi observado entre 35 e 60°C, com solução de lactose inicial de 40% em tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 5,0 e 10 U/mL de β -galactosidase.

4.9 Efeito do tempo de reação na síntese de Galactooligossacarídeo

O perfil da produção de GOS em relação ao tempo foi realizado utilizando-se solução de lactose com concentração inicial de 40% em tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 5,0 e 10 U/mL de β -galactosidase a 45°C, durante 12, 24 e 48 horas de reação.

4.10 Análise dos produtos formados

4.10.1 Cromatografia em papel

A presença de atividade de transgalactosilação pela enzima β -galactosidase, foi avaliada por cromatografia em papel.

A cromatografia foi realizada em papel Whatman nº 1, sendo aplicados 1 μ L das amostras e das soluções padrões, preparadas a 1% (p/v).

O processo cromatográfico descendente foi desenvolvido por aproximadamente 24 horas, utilizando-se como sistema de solvente acetato de

etila, álcool isopropílico e água na proporção 6:3:1 (v/v). O cromatograma foi revelado com o reagente difenilamina-anilina-ácido fosfórico, seguido de aquecimento em estufa a 100°C (LUND e WYATT, 1973).

4.10.2 Cromatografia Líquida de alta eficiência (CLAE)

Os produtos obtidos pela síntese da enzima foram analisados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), utilizando um Cromatógrafo Líquido Waters e coluna Supelcogel™ Ca (300 x 7,8mm). Foi utilizada água ultra pura como solvente a um fluxo de 0,5 mL/min a 80°C. Foram aplicados 20 µL das amostras e das soluções padrões, preparadas a 0,5% (p/v). Os carboidratos foram detectados pelo índice de refração e identificados por comparação com o tempo de retenção dos padrões de glicose, galactose, lactose e 4'galactosil-lactose (tetrassacarídeo).

5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Produção de β -galactosidase

A linhagem de *Scopulariopsis* sp teve bom crescimento no meio semi-sólido composto de farelo de trigo e água na proporção de 1:1 (p/v) e produziu a enzima β -galactosidase. Esta atividade foi iniciada após o quinto dia de fermentação, atingindo o seu máximo após o sétimo dia de crescimento. A linhagem fungica sintetizou a enzima sem a necessidade do indutor lactose, demonstrando ser uma enzima constitutiva. A Figura 2 mostra a atividade de β -galactosidase (μmol de ONP/mg/min) durante 15 dias de fermentação. A maioria dos microrganismos relatados na literatura necessita de lactose para a produção de β -galactosidase (NAKAO et al., 1994; ONISHI e TANAKA, 1996, HSU, YU e CHOU, 2005, ISHIKAWA et al., 2005).

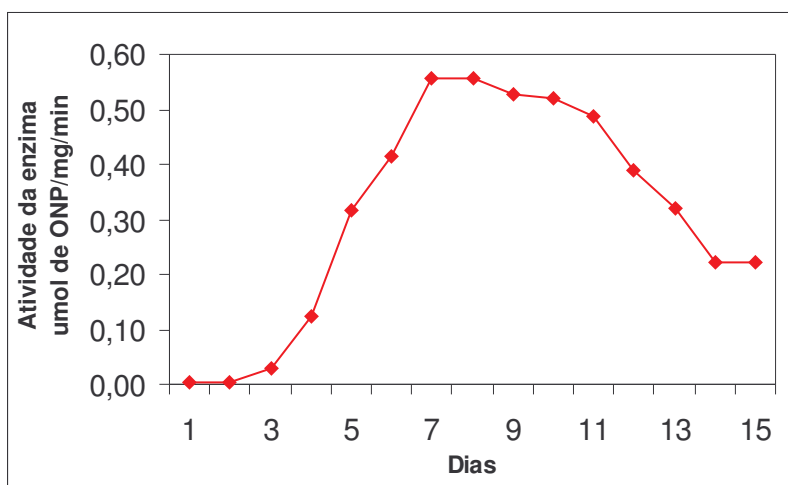


Figura 2 – Produção de β -galactosidase a partir de *Scopulariopsis* sp, por fermentação semi-sólida em meio farelo de trigo.

O farelo de trigo demonstrou ser um bom substrato para o fungo *Scopulariopsis* sp, que teve um ótimo crescimento e produziu a enzima β -galactosidase. Este substrato ainda se torna de grande interesse para cultivo do *Scopulariopsis* sp por ser um subproduto da indústria de alimentos, com baixo valor agregado.

5.1.1 Preparação do extrato semi-purificado

Utilizando-se as técnicas de precipitação por álcool etílico relatado por ALMEIDA (2003), foram obtidos 8,24g de extrato da enzima β -galactosidase, por 6,5L de extrato bruto. O etanol foi adicionado lentamente mantendo-se a temperatura, em torno de 4°C. Essa condição branda de precipitação evita que a enzima desnature, perdendo a atividade.

5.2 Produção de Galactooligossacarídeo

5.2.1 Efeito da concentração da lactose na síntese de GOS

O cromatograma apresentado na Figura 3 mostra os produtos da reação da enzima β -galactosidase na formação de GOS. Observa-se que os “spots” superiores foram indicados como os açúcares glicose e galactose, pela comparação das distâncias percorridas (R_f) pelos padrões e os “spots” indicados por seta, como compostos de maior peso molecular. Pela intensidade de coloração foi observado que, quanto mais lactose houver no sistema maior será a produção de GOS, (LÓPEZ-LEIVA e GUSMAN, 1995; ALBAYRAK e YABG, 2002; ROY et al., 2002).

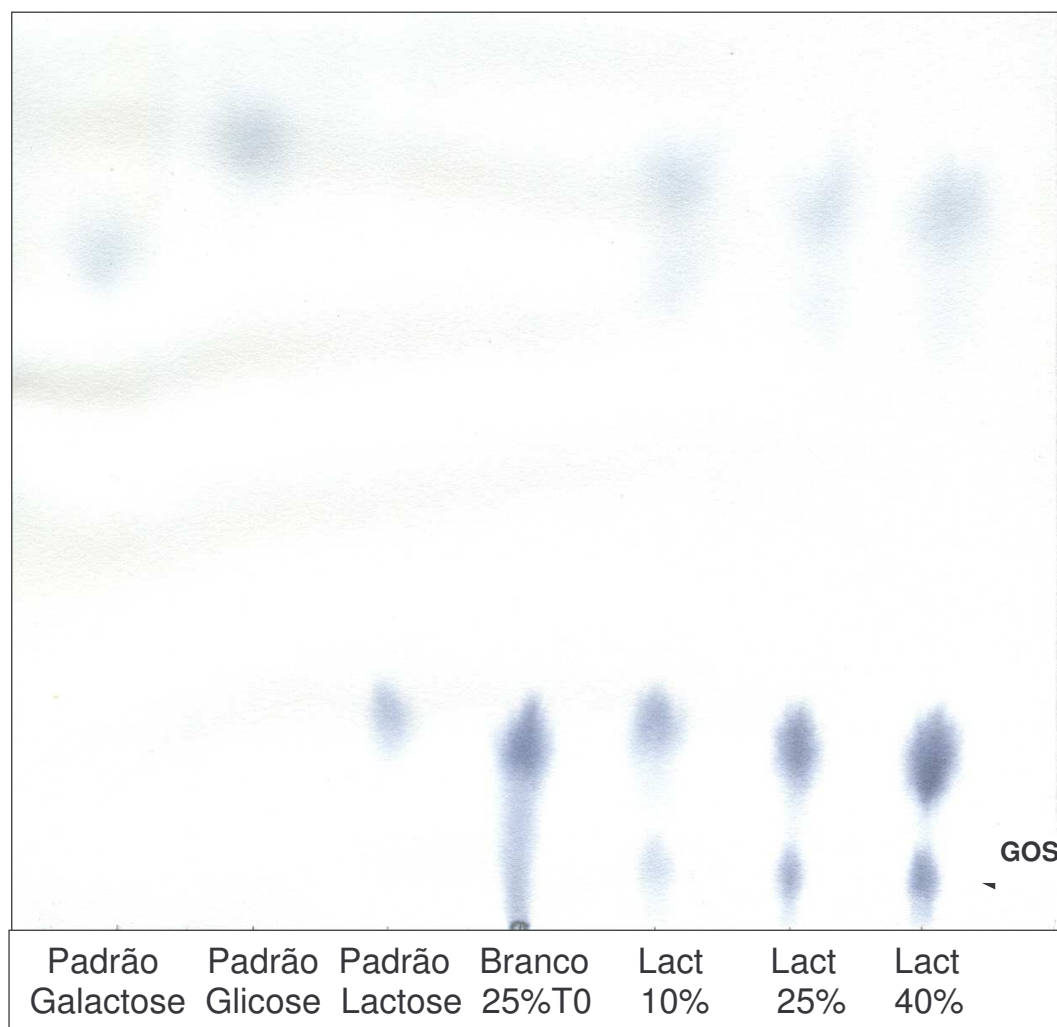


Figura 3 – Efeito da concentração de lactose na produção de GOS, durante 24h utilizando-se β -galactosidase de *Scopulariopsis* sp. Foram aplicados 1 μ L das amostras e das soluções padrões, preparadas a 1% (p/v).

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

concentração de lactose que aumenta a quantidade de oligossacarídeos presentes (CHOCKCHAI SAWASDEE et al., 2005).

O número de oligossacarídeos formados a partir da lactose via reação de transferência varia de três a onze (AKIYAMA et al., 2001). O tipo de galactooligossacarídeo formado depende do microrganismo, das condições de cultivo e do sistema empregado.

O efeito da concentração inicial de lactose é observado em relação ao tempo da síntese de GOS. A transgalactosilação é uma reação cinética favorecida por elevadas concentrações iniciais de lactose. CHOCKCHAI SAWASDEE et al., (2005) testaram quatro concentrações de lactose, sendo 220, 280, 340 e 400mg/mL, juntamente com 2,9, 5,8 e 8,7U/mL da enzima β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis*, na produção de GOS. Obtiveram a concentração máxima de GOS com 400mg/mL de lactose (40%), e 5,8U/mL da enzima, na temperatura 40°C, pH 7,0, em 4 horas.

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

O efeito de altas temperaturas na atividade da β -galactosidase foi observado claramente a respeito da quantidade, do tipo e do tamanho de

moléculas dos oligossacarídeos. A β -galactosidase do *Kluyveromyces* spp. produziu principalmente trissacarídeos.

Pode-se observar pela Figura 4 que o aumento da lactose no meio influenciou a produção de GOS. Obtendo-se a produção máxima em 12 horas de reação na proporção de 40% de lactose.

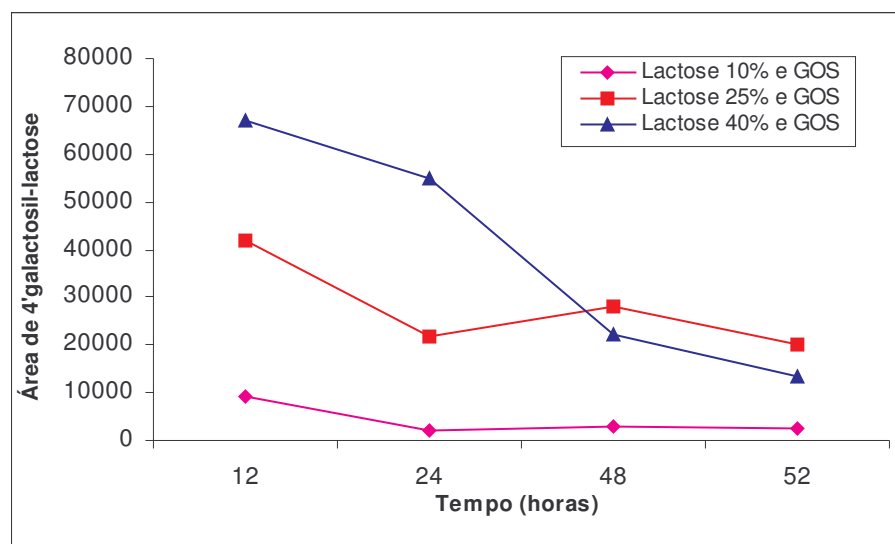


Figura 4 – Efeito da concentração de lactose, na produção de GOS por β -galactosidase de *Scopulariopsis* sp.

5.2.2 Efeito da concentração da enzima na síntese de Galactooligossacarídeo

Com o propósito de avaliar o efeito da concentração de β -galactosidase na síntese de GOS foram testadas várias concentrações da enzima, como apresentado na Figura 5. Com as menores concentrações de enzima (0,5; 1 e 2U/mL) ocorreu aumento gradativo da síntese de GOS. Nas concentrações mais elevadas (6-8U/mL), o maior rendimento encontra-se em 24 horas de reação, ocorrendo em seguida uma diminuição da produção. Os dados demonstram que com maiores concentrações de enzima (8 a 10U/mL) a reação se processa

rapidamente, obtendo rendimento máximo em tempos mais curtos, de 12h de reação, como mostrado na Figura 5 e a partir desse patamar, começa a estabilizar o rendimento de produção, talvez devido à inibição da reação por algum produto formado ou por hidrólise dos oligossacarídeos.

A reação enzimática na concentração de 0,5U/mL resultou no menor rendimento até 48 horas de reação, e com 1U/mL de β -galactosidase houve a necessidade de mais tempo para se alcançar os mesmos níveis obtidos de produto, quando comparado com o emprego de 2U/mL de enzima. Aumentando-se a concentração de β -galactosidase para 8 e 10U/mL houve melhora no rendimento (Figura 6), como já observado na literatura, CHOCKCHAI SAWASDEE, et al. (2005), indicaram que o aumento da concentração da enzima não é proporcional ao aumento da síntese de oligossacarídeos, e que a limitação da produção não está relacionada apenas com a concentração da enzima.

Quando observada a composição dos carboidratos (Figura 6) ocorre a diminuição dos teores de lactose devido a hidrólise do dissacarídeo. Como não há concentrações equimolares de galactose e glicose, sendo que esta última encontra-se em maior concentração que a galactose, pode-se sugerir que os oligossacarídeos formados são compostos por mais moléculas de galactose que glicose. Isto de fato ocorre com o trissacarídeo 4'galactosil-lactose, formado por duas moléculas de galactose e uma de glicose, e este GOS apresenta comprovada função bifidogênica (OHTSUOKA et al., 1989, MWENYA et al., 2004).

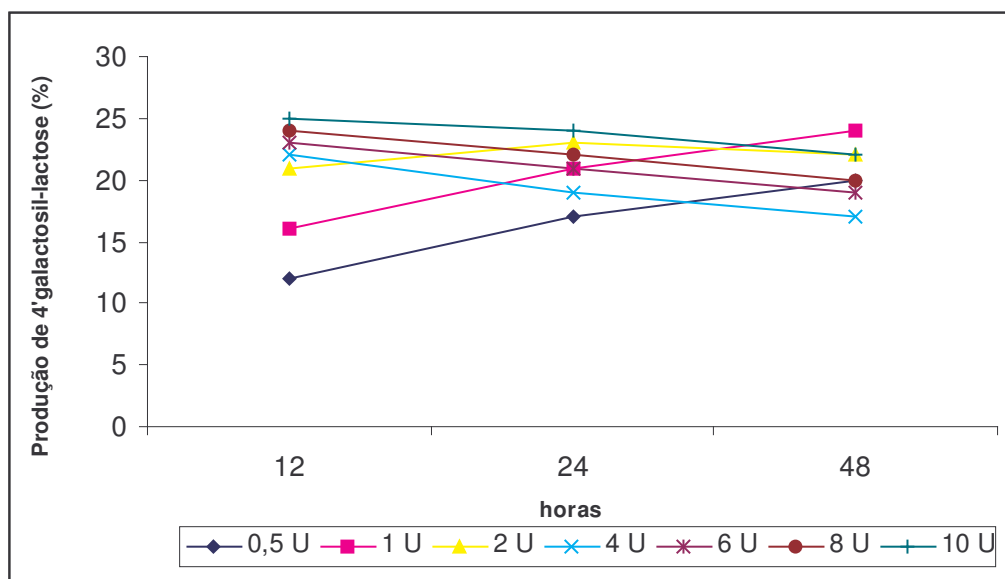


Figura 5 – Efeito da concentração de β -galactosidase e do tempo de reação na síntese de 4'galactosil-lactose.

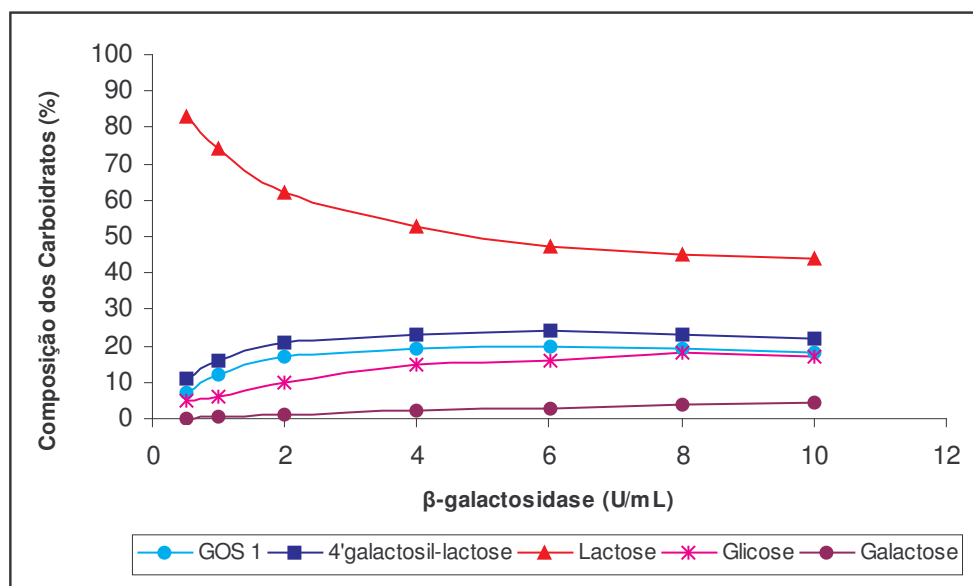


Figura 6 – Efeito da concentração de β -galactosidase na concentração de 4'galactosil-lactose, glicose e galactose a partir de solução de lactose a 40% em pH 5.0 em 48h de reação.

5.2.3 Efeito da temperatura na síntese de Galactooligossacarídeo

O efeito da temperatura na síntese de galactooligossacarídeos foi observado em 35, 45 e 60°C. Nas análises realizadas com a β -galactosidase de *Scopulariopsis* sp, quando a temperatura do sistema de reação era de 35°C não houve produção de GOS, em 45°C verificou-se que houve produção de GOS em todos os tempos, como mostra a Figura 7 e finalmente a 60°C não houve produção de GOS, verificando-se que a temperatura elevada desfavorece a produção de GOS, em tempos de reação prolongado. Ao contrário do resultado obtido por ONISHI e TANAKA, 1995, verificaram que a temperatura ótima para reação de transgalactosilação foi de 80°C, para β -galactosidase de *Sterigmatomyces elviae* CBS8119, a produção de GOS pela β -galactosidase de *Scopulariopsis* sp foi mais eficiente com o emprego de temperatura mais branda, 45°C. Esse efeito foi maximizado em 12 horas de reação.

Lembrando que as fontes distintas da enzima β -galactosidase, se tratando de dois microrganismos apresentam propriedades diferentes de atuação na síntese de galactooligossacarídeo.

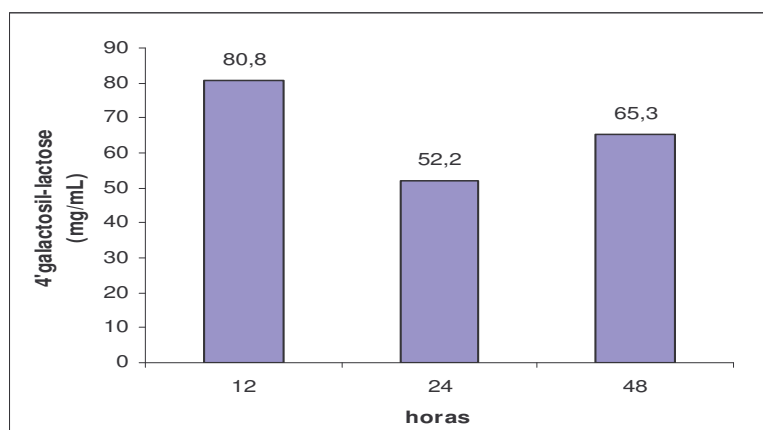


Figura 7 – Produção de 4'galactosil-lactose, a 45°C, a partir de solução de lactose a 40% em pH 5.0.

5.2.4 Efeito do tempo de reação na síntese de galactooligossacarídeo

Para observar a síntese de GOS em relação ao tempo de reação foram fixados os parâmetros considerados mais satisfatórios para o processo. A concentração de lactose foi fixada em 40%, pois sua hidrólise ocorre predominantemente em baixas concentrações, enquanto que a produção de oligossacarídeos por reação de transgalactosilação ocorre predominantemente em alta concentração do substrato. Vários autores (ALBAYRAK e YANG, 2002; HSU, YU e CHOU, 2005) relatam a importância desta alta concentração na síntese de galactooligossacarídeo.

O trissacarídeo 4'galactosil-lactose foi preferencialmente formado pela β -galactosidase de *Sporobolomyces singularis* (ISHIKAWA et al., 2005) e *Sterigmatomyces elviae* (ONISHI et al., 1996). Outros trissacarídeos como 6'galactosil-lactose foram sintetizados por β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* (GAUR et al., 2005). Em toda a literatura consultada verificou-se que na reação de transgalactosilação catalisada pela β -galactosidase, ocorreu maior formação de trissacarídeos. De acordo com BERGER et al. (1995) isto provavelmente ocorra porque os trissacarídeos são os precursores para a síntese dos tetrassacarídeos.

A alta produção de 4'galactosil-lactose [*O*- β -D-Gal-(1-4)- β -D-Gal-(1-4)-D-Gli] é de grande interesse porque tem sido considerado um efetivo promotor de crescimento de bifidobactérias (MORO et al., 2002; MWENYA et al., 2004).

A produção de galactooligossacarídeo foi baixa no período inferior a 6 horas de reação. A partir de 12h houve uma estabilidade de produção (Figura 8), mesmo após 12, 24, e 48 de reação, o que pode ser explicado 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, PRASAD e GILL, 2003).

Após 12h de reação, menor quantidade de galactose foi formada em relação a glicose, sugerindo que a enzima β -galactosidase de *Scopulariopsis* sp apresenta maior atividade de transgalactosilação que de hidrólise. Pode-se verificar que em 12h de reação, houve uma conversão de 22% da lactose em galactooligossacarídeos.

Por outro lado, na produção de GOS por β -galactosidase de *Aspergillus oryzae*, obteve-se um pequeno aumento na produção, após 48h de reação, porém em todos os tempos as quantidades foram consideravelmente inferiores ao da β -galactosidase de *Scopulariopsis* sp (Figura 9).

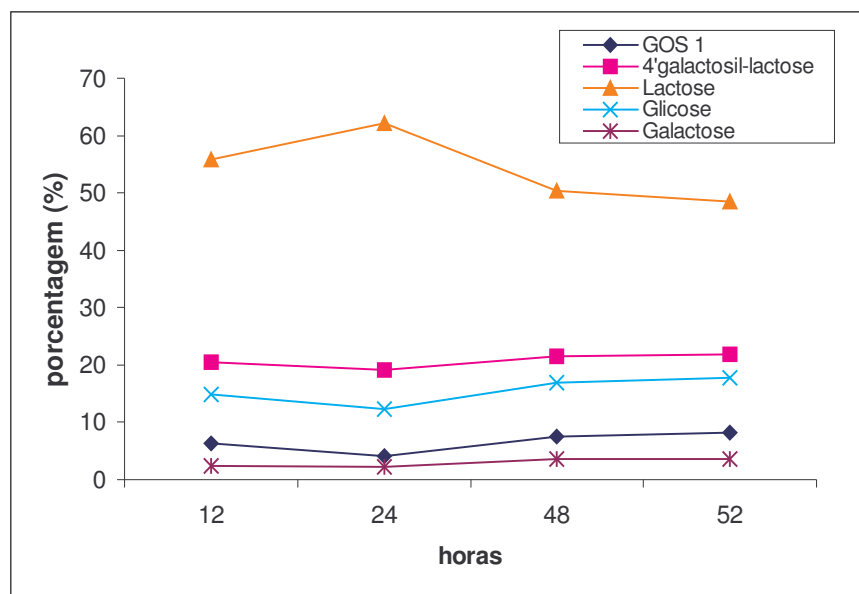


Figura 8 – Produção de GOS em relação ao tempo de reação. Utilizando lactose 40% (p/v) em pH 5.0 e 10U/mL de β -galactosidase de *Scopulariopsis* sp.

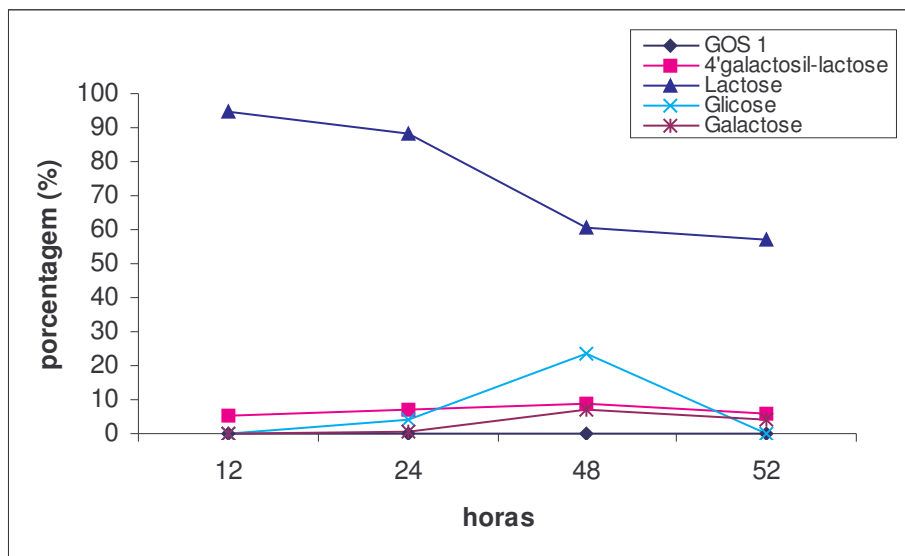


Figura 9 – Produção de GOS em relação ao tempo de reação. Utilizando lactose 40% (p/v) em pH 5.0 e 10U/mL de β -galactosidase de *Aspergillus oryzae*.

Os resultados obtidos neste estudo estão próximos aos encontrados por outros autores, apesar de serem em diferentes condições experimentais. LÓPEZ-LEIVA e GUZMAN 1995, usando β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* imobilizada, reportaram um rendimento máximo de 14% de GOS, com 20-40% de conversão de lactose em GOS. IWASAKI et al.1996, utilizando a mesma fonte de enzima, obtiveram 32% de conversão, sendo o sistema de reação composto com 38% de lactose à 40°C e pH 4.5. ONISHI e TANAKA (1997) obtiveram 72mg/mL de GOS após incubação em 20% de lactose, pH 5, 60°C por 24h. A conversão da lactose foi de 14% e β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* levou a 17,9% de oligossacarídeos, em pH 5 e 35°C (RUSTOM et al., 1998). SHIN et al.(1998) produziram 160 mg/mL de GOS utilizando β -galactosidase de *B. singularis* em 30% de lactose à 45°C e pH 3,7.

5.3 Avaliação da produção de galactooligossacarídeos

5.3.1 Cromatografia em papel

Os cromatogramas obtidos por cromatografia de papel estão apresentados na Figura 10 e 11.

A capacidade da β -galactosidase de *Scopulariopsis* sp em realizar a reação de transferência e síntese foi testada. O volume de aplicação das amostras foi padronizado para que se pudesse ter uma idéia de concentrações.

Conforme visualizado na Figura 10, os “spots” da parte superior, acima dos indicados pela seta, foram identificadas como lactose, por apresentarem o mesmo R_f do padrão. Abaixo da lactose observa-se a separação de compostos (indicados por setas) de maiores pesos moleculares que o dissacarídeo, podendo-se sugerir serem trissacarídeos ou tetrassacarídeos.

Pode-se verificar, que com o aumento do tempo de produção os “spots” começaram a aparecer com coloração mais intensa, indicando a ocorrência de produção de GOS.

Nos cromatogramas abaixo (Figura 10 e 11), foram analisados as concentrações de lactose em comparação com o efeito do tempo de reação na produção de GOS a partir de solução de lactose a 40% (p/v) utilizando-se β -galactosidase de *Scopulariopsis* sp.

Cromatografia em papel, foram analisados os tempos 12, 24 e 36h, a intensidade dos “spots”, indicou que a concentração de lactose em 40% era mais satisfatório, em relação a produção de GOS.

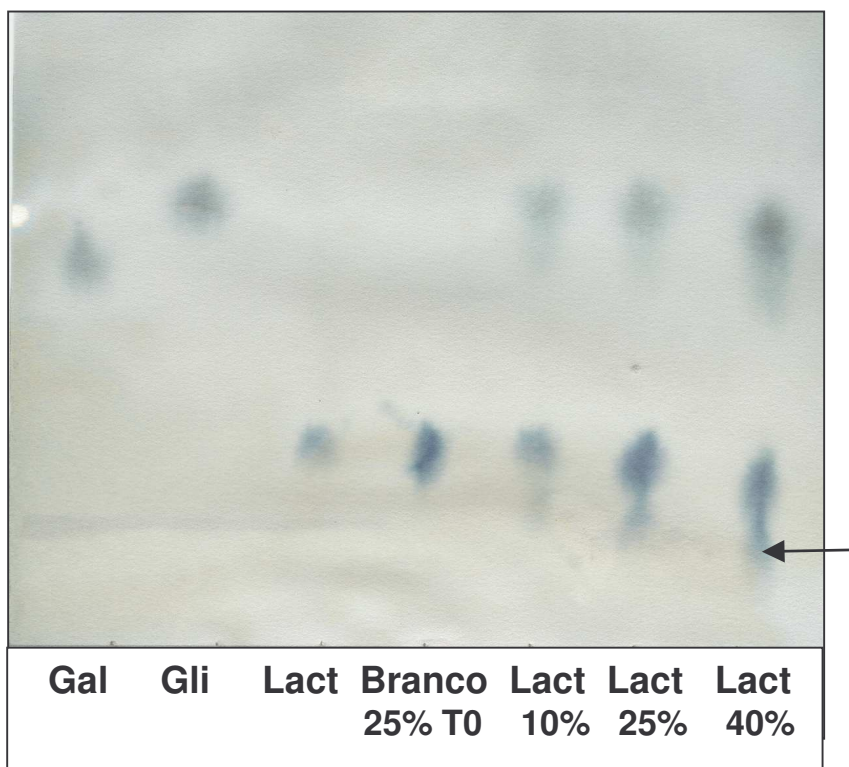


Figura 10. Cromatografia em papel, tendo como fase móvel acetato de etila, álcool isopropílico e água (6:3:1). Utilizando, 10, 25 e 40% de lactose, pH 5.0, 10U/mL de β -galactosidase de *Scopulariopsis* sp, durante 12 horas de reação.

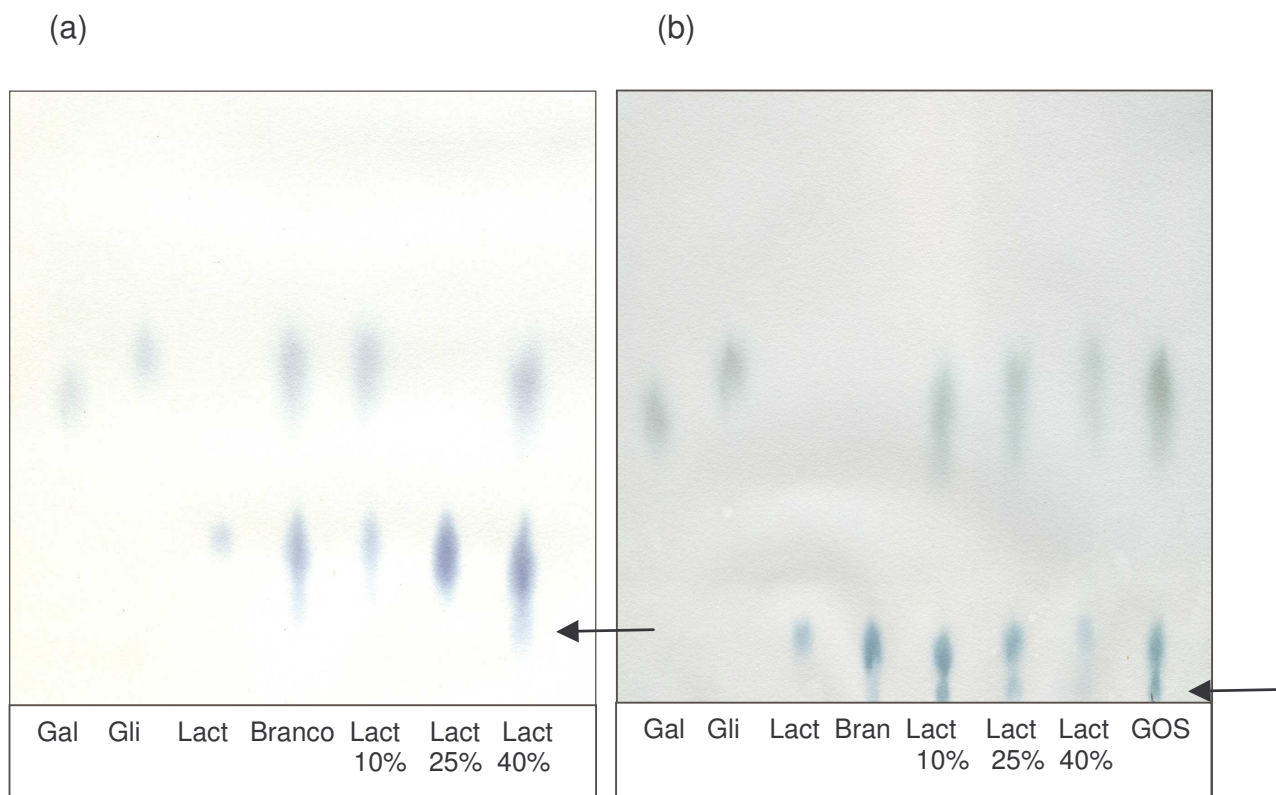


Figura 11. Cromatografia em papel, tendo como fase móvel acetato de etila, álcool isopropílico e água (6:3:1) e revelador difenilamina-anilina-ácido fosfórico. Utilizando, 10, 25 e 40% de lactose, pH 5.0, 10U/mL de β -galactosidase de *Scopulariopsis*, durante 24h (a) e 36h (b) de reação.

5.3.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

A conversão de lactose em GOS foi analisada por CLAE e o perfil cromatográfico obtido está apresentado nas Figuras 12, 13, 14, 15, 16 e 17. Nas amostras analisadas foram identificados os carboidratos galactose, glicose, lactose e 4'galactosil-lactose.

A coluna cromatográfica (SupelcogelTM Ca) utilizada na CLAE separa os compostos pelo peso molecular.

Observa-se que o oligossacarídeo 4'galactosil-lactose é eluído antes dos monossacarídeos e da Lactose. Foi observada a formação de outro

oligossacarídeo cuja natureza não pôde ser identificada pela inexistência de padrão. Foram realizadas também análises pelo tempo de retenção dos padrões e por cocromatografia.

Os cromatogramas apresentados, foram analisados comparativamente em relação ao tempo de produção de GOS, usando a β -galactosidase semi-purificada de *Scopulariopsis* sp e a β -galactosidase purificada de *Aspergillus oryzae*.

É visível nos cromatogramas que a β -galactosidase purificada de *Aspergillus oryzae* sintetizou uma quantidade de GOS bem menor que a β -galactosidase semi-purificada de *Scopulariopsis* sp. A pequena quantidade de GOS, produzido por β -galactosidase purificada de *Aspergillus oryzae*, influenciou na integração dos picos na CLAE.

A enzima obtida a partir de *Scopulariopsis* sp produziu 80,8, 50,2 e 65,3mg/mL de 4'galactosil-lactose, em relação ao tempo de 12, 24 e 48 horas, respectivamente, sendo uma quantidade três vezes maior quando comparado com a β -galactosidase comercial de *Aspergillus oryzae*, nas mesmas concentrações da enzima.

A utilização da β -galactosidase de *Scopulariopsis* sp, resultou num perfil de oligossacarídeos diferentes do obtido pela β -galactosidase de *Aspergillus oryzae*, houve a síntese de um oligossacarídeo que eluíu em 8,945 minutos, denominado de GOS 1. O oligossacarídeo denominado de GOS 2 presente nos cromatogramas das reações com ambas enzimas eluiu em 9,652 minutos, foi identificado como 4'galactosil-lactose, de acordo com padrão autêntico, tendo o mesmo tempo de retenção e também comparado com co-cromatografia. No entanto a enzima

extraída de *Scopulariopsis* sp foi mais eficiente para sintetizá-lo nos variados tempos de reação (12 a 48hs), analisando a mesma concentração da enzima (10U/mL).

Gaur et al. (2005) estudaram um método apropriado de imobilização para a β -galactosidase que pode ser aplicável em síntese de oligossacarídeos. Houve uma avaliação comparativa das três principais técnicas de imobilização (adsorção, acoplamento covalente de quitosana e agregação de enzima cross-linked – CLEA) de β -galactosidase por *Aspergillus oryzae*. Estas técnicas foram comparadas em termos de rendimento da preparação do imobilizado, característica enzimática, estabilidade e eficiência na síntese de oligossacarídeos. Usando 20% (p/v) de lactose, a enzima imobilizada em quitosana obteve rendimento máximo de oligossacarídeos (17,3% de açúcar total) quando comparado da enzima livre (10%) em 2h a 40°C. CLEA foi escolhido pela eficiência da hidrólise de lactose que obteve 78% de monossacarídeos em 12h.

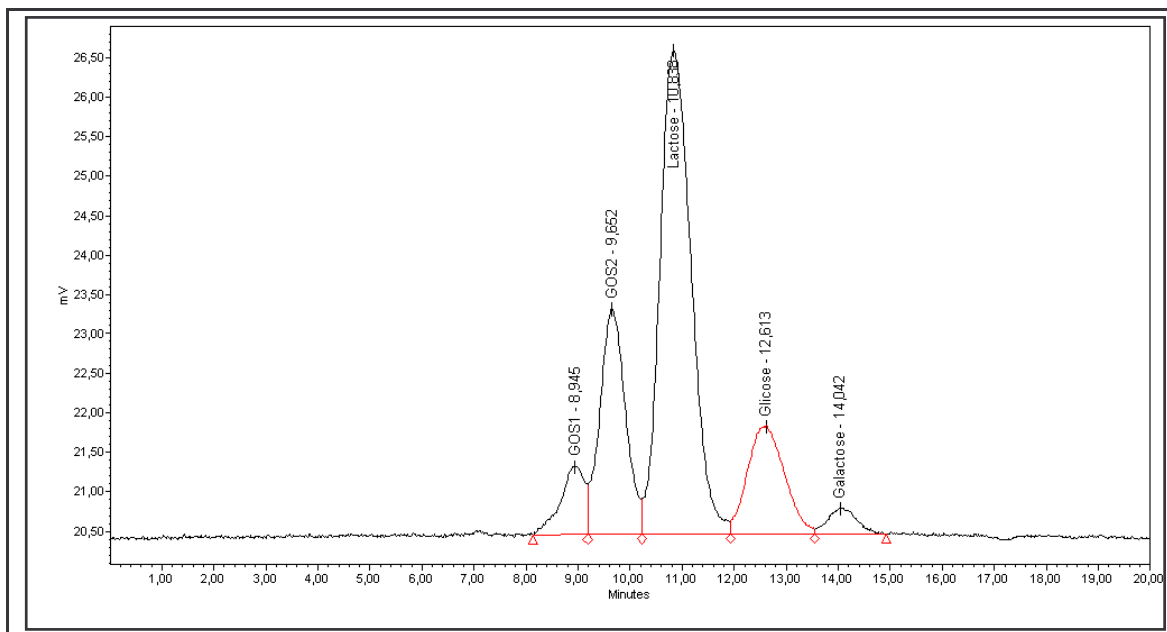


Figura 12. Perfil cromatográfico da mistura de carboidrato por CLAE. Amostra de açúcares obtida após conversão da lactose 40% (p/v) em GOS, utilizando-se 10U/mL de β -galactosidase de *Scopulariopsis* sp em 12 horas de reação em pH 5.0 à 45°C.

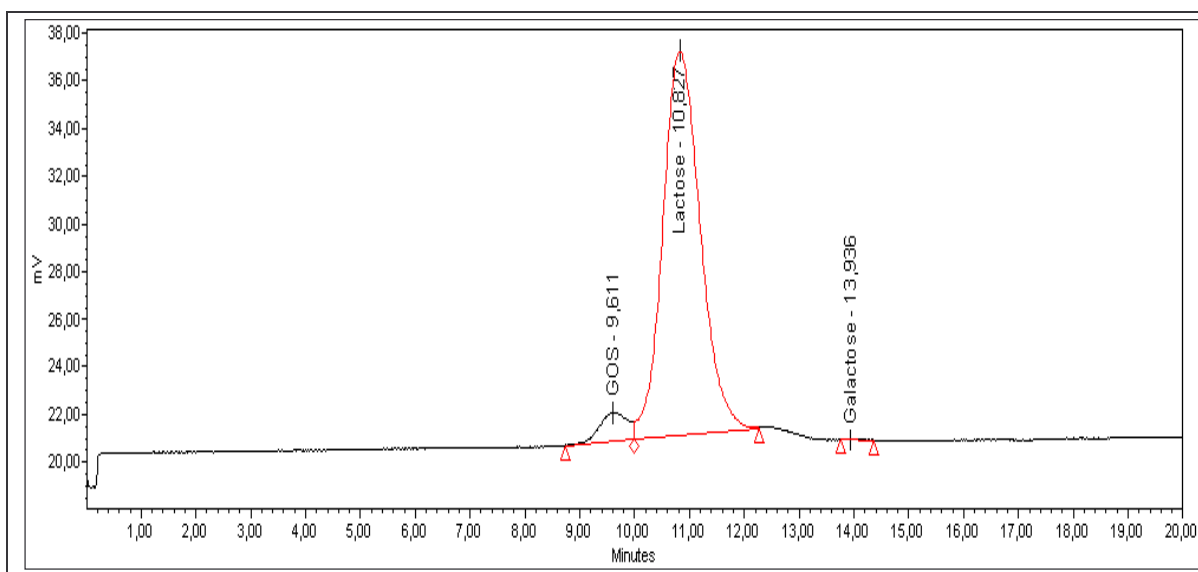


Figura 13. Perfil cromatográfico da mistura de carboidrato por CLAE. Amostra de açúcares obtida após conversão da lactose 40% (p/v) em GOS, utilizando-se 10U/mL de β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* em 12 horas de reação em pH 4.5 à 45°C.

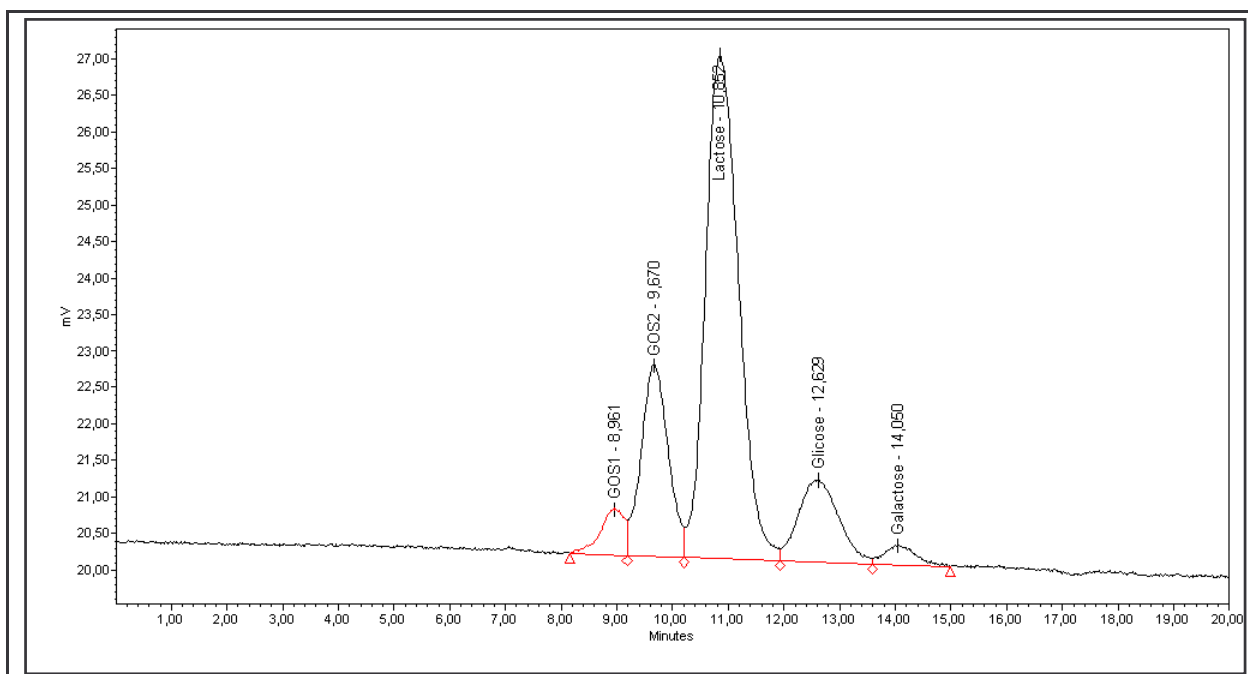


Figura 14. Perfil cromatográfico da mistura de carboidrato por CLAE. Amostra de açúcares obtida após conversão da lactose 40% (p/v) em GOS, utilizando-se 10U/mL de β -galactosidase de *Scopulariopsis* sp em 24 horas de reação em pH 5.0 à 45°C.

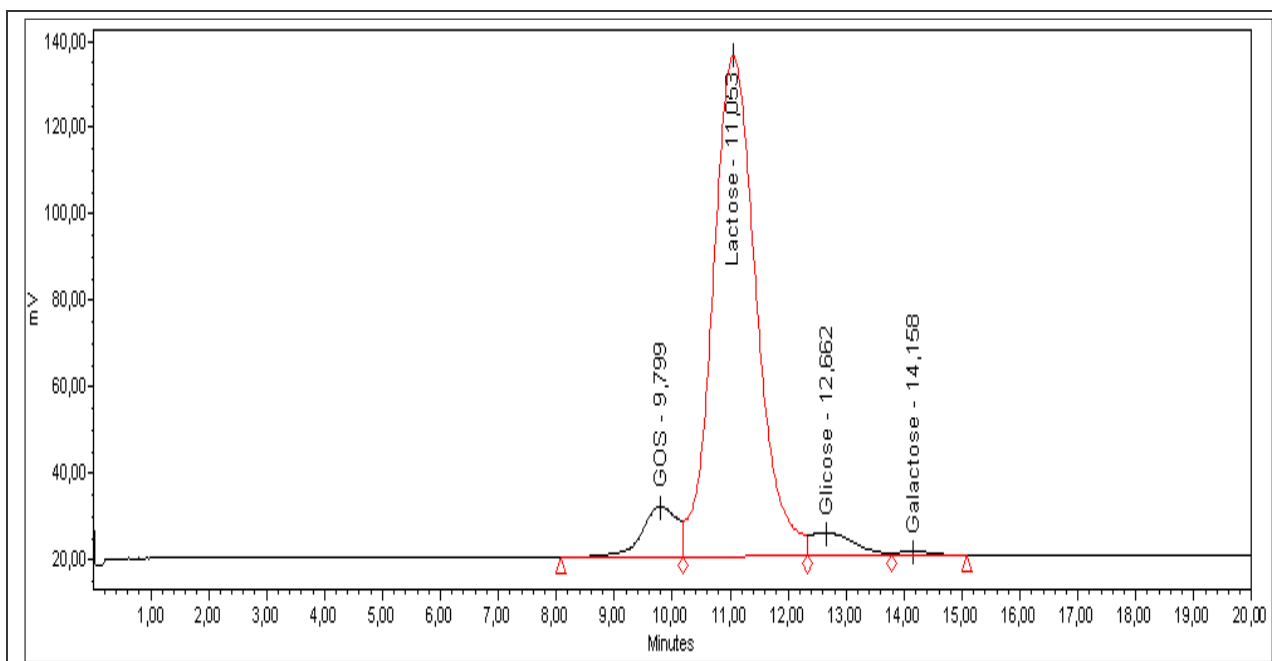


Figura 15. Perfil cromatográfico da mistura de carboidrato por CLAE. Amostra de açúcares obtida após conversão da lactose 40% (p/v) em GOS, utilizando-se 10U/mL de β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* em 24 horas de reação em pH 4.5 à 45°C.

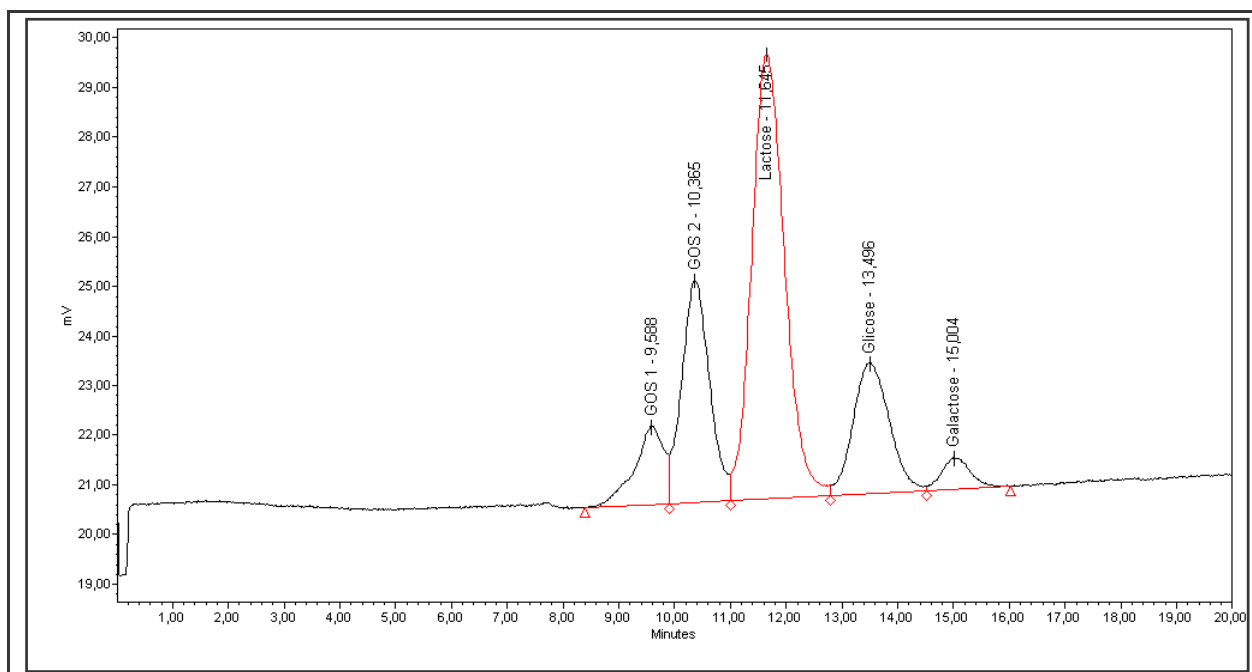


Figura 16. Perfil cromatográfico da mistura de carboidrato por CLAE. Amostra de açúcares obtida após conversão da lactose 40% (p/v) em GOS, utilizando-se 10U/mL de β -galactosidase de *Scopulariopsis* sp em 48 horas de reação em pH 5.0 à 45°C.

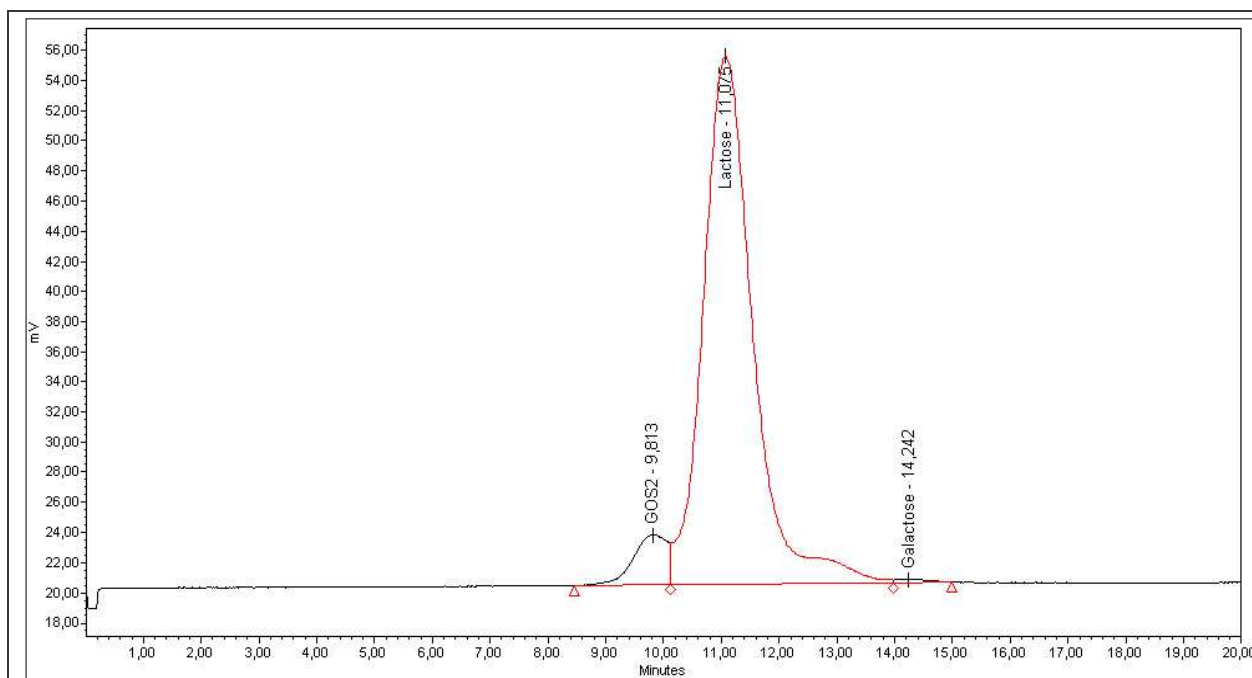


Figura 17. Perfil cromatográfico da mistura de carboidrato por CLAE. Amostra de açúcares obtida após conversão da lactose 40% (p/v) em GOS, utilizando-se 10U/mL de β -galactosidase de *Aspergillus oryzae*, em 48 horas de reação em pH 4.5 à 45°C.

Foram realizadas outras análises com uma maior concentração de β -galactosidase purificada de *Aspergillus oryzae*, foi necessário uma concentração 19 vezes maior para obter uma quantidade de 4'galacosil-lactose (GOS) semelhante ao da β -galactosidase semi-purificada de *Scopulariopsis* sp, como mostrado nas Figuras 18,19 e 20.

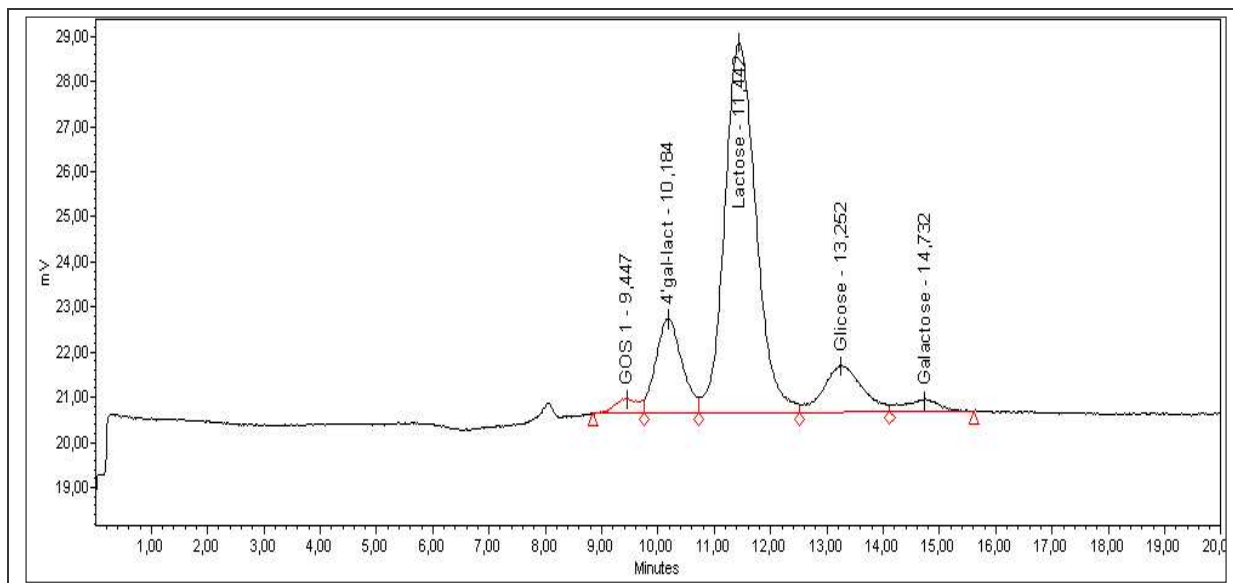


Figura 18. Perfil cromatográfico da mistura de carboidrato por CLAE. Amostra de açúcares obtida após conversão da lactose 40% (p/v) em GOS, utilizando-se 190U/mL de β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* em 12 horas de reação em pH 4.5 à 45°C.

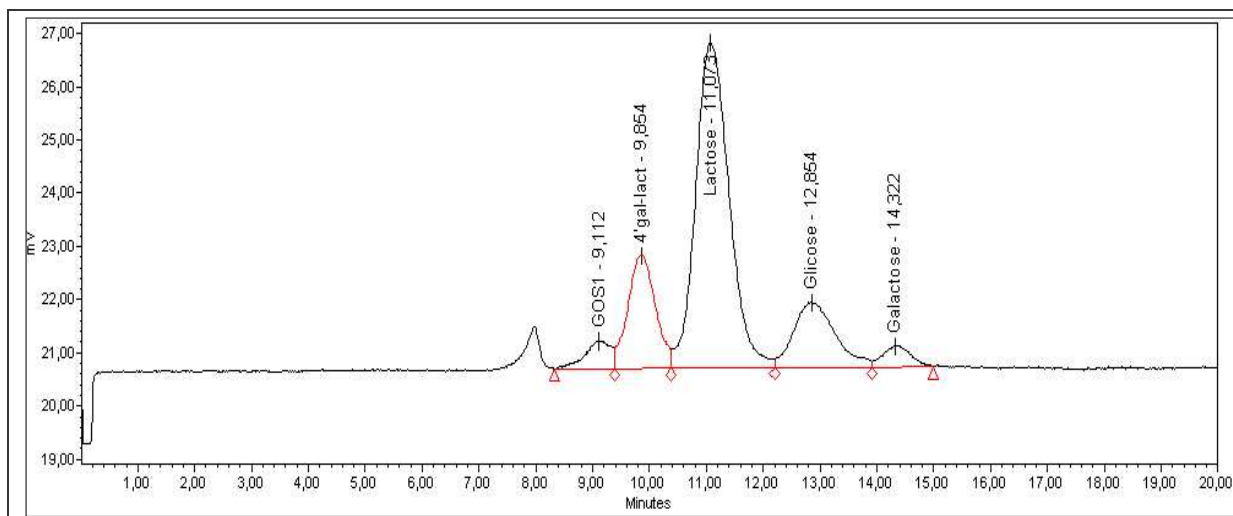


Figura 19. Perfil cromatográfico da mistura de carboidrato por CLAE. Amostra de açúcares obtida após conversão da lactose 40% (p/v) em GOS, utilizando-se 190U/mL de β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* em 24 horas de reação em pH 4.5 à 45°C.

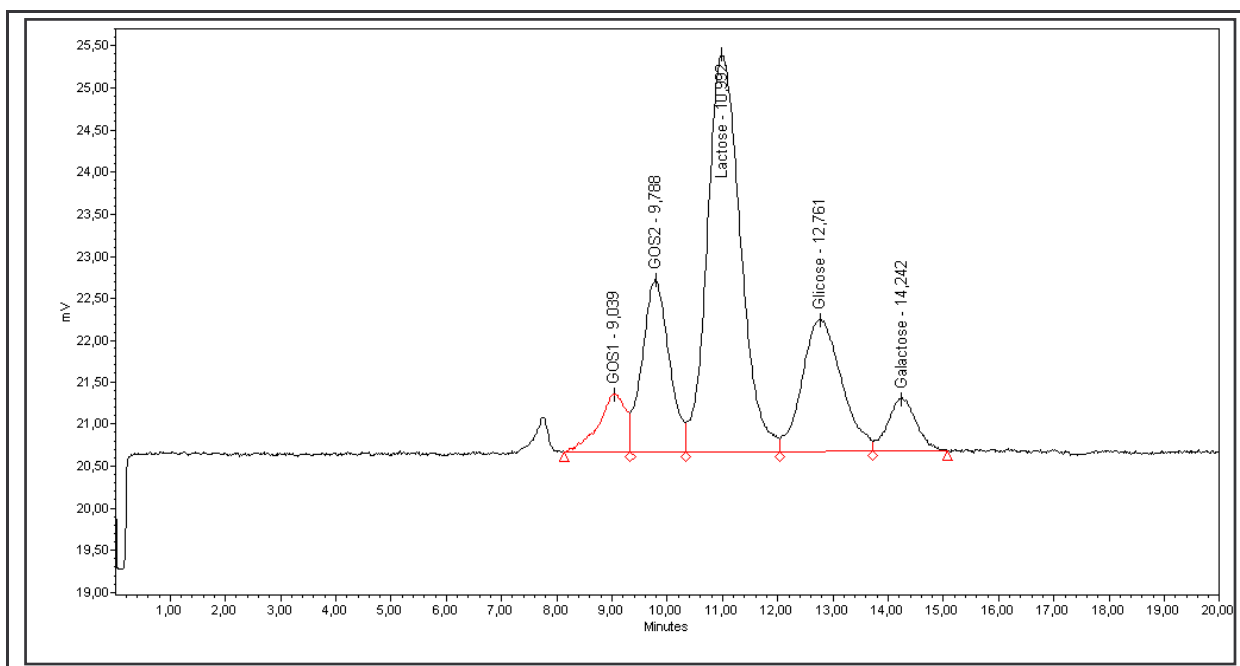


Figura 20. Perfil cromatográfico da mistura de carboidrato por CLAE. Amostra de açúcares obtida após conversão da lactose 40% (p/v) em GOS, utilizando-se 190U/mL de β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* em 48 horas de reação em pH 4.5 à 45°C.

Foram utilizados 40%(w/v) de solução de lactose (em 0,1M de tampão acetato de sódio), a concentração de enzima para a síntese de GOS foi de 10U/mL, seguindo as condições ótimas de produção de enzima para cada microrganismo, a temperatura de atividade de galactosiltransferase foi de 45°C, pH 5.0 para *Scopulariopsis sp* e 40°C, pH 4.5 para *Aspergillus oryzae*. A enzima obtida a partir de *Scopulariopsis sp* converteu 20% de lactose em oligossacarídeos (80,8 mg/mL de 4'galactosyl-lactose), comparando com *Aspergillus oryzae* que converteu 6% de lactose em oligossacarídeos (25,6 mg/mL de 4'galactosyl-lactose) e o melhor tempo foi o de 12h de reação, como mostrados na Figura 21.

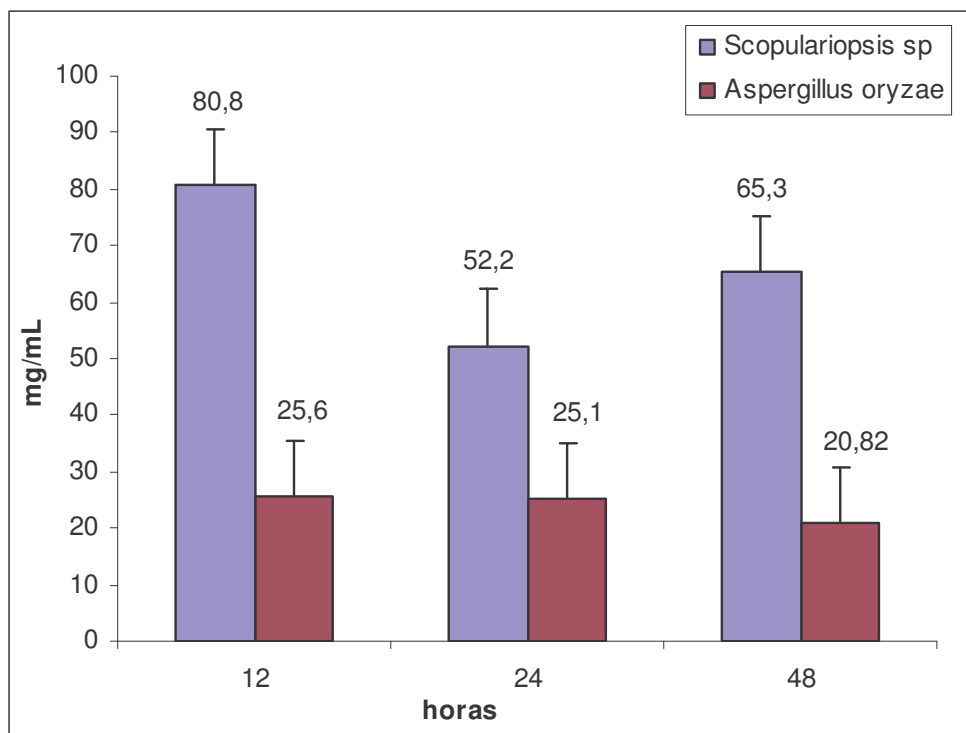


Figura 21. – Produção de 4'galactosil-lactose em relação ao tempo, utilizando lactose 40% (p/v), pH 5.0 e 10U/mL de β -galactosidase de *Scopulariopsis sp* e *Aspergillus oryzae*.

6 – CONCLUSÕES

O microrganismo *Scopulariopsis* sp produziu a enzima β -galactosidase por fermentação semi-sólida em meio de farelo de trigo e água na proporção 1:1 (p/v).

A β -galactosidase de *Scopulariopsis* sp apresentou alta atividade de transgalactosilação, sintetizando em maior quantidade o trissacarídeo 4'galactosil-lactose em relação à β -galactosidase de *Aspergillus oryzae*, nas mesmas condições experimentais.

A enzima obtida a partir de *Scopulariopsis* sp converteu 20% de lactose em oligossacarídeos (80,8 mg/mL de 4'galactosyl-lactose), comparando com *Aspergillus oryzae* que converteu 6% de lactose em oligossacarídeos (25,6 mg/mL de 4'galactosyl-lactose). Utilizou-se lactose 40% (p/v), à 45°C, pH 5,0 e 10U/mL e o melhor tempo foi o de 12h de reação.

Os maiores rendimentos de produção de GOS foram obtidos com 10 U/mL de β -galactosidase, sendo que o aumento da concentração da enzima não é proporcional ao aumento da síntese de GOS.

Temperaturas mais elevadas aceleraram a síntese de GOS nas primeiras horas, porém não teve rendimento significativo, comparado ao obtido à 45°C com 12 horas de reação um rendimento próximo ao máximo.

Nas melhores condições encontradas e com o máximo de lactose (40%) que se conseguiu solubilizar no sistema de reação, a maior produção de GOS ocorreu em 12 horas de reação e uma conversão de 20% da lactose em galactooligossacarídeos.

A atividade de transgalactosilação da β -galactosidase parece ser inibida pelo aumento de glicose no sistema.

7 – PERSPECTIVAS FUTURAS

A atividade de transgalactosilação da β -galactosidase parece ser inibida pelo aumento de glicose no sistema. Na tentativa de diminuir a glicose do meio, seria de interesse estudar a aplicação de enzimas, como a glicose oxidase, por exemplo, que utilizasse a glicose resultante da produção de galactooligossacarídeo.

Há a necessidade de estabelecer uma produção contínua e eficiente de galactooligossacarídeos, estudando os melhores sistemas de reação, acoplado a um eficiente sistema de produção de lactase.

Outra linha a ser pesquisada é a clonagem do gene do *Scopulariopsis* sp e que produzissem em menor tempo a lactase.

8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALBAYRAK, N., YANG, S. T. Production of galacto-oligosaccharides from lactose by *Aspergillus oryzae* beta-galactosidase immobilized on cotton cloth. **Biotechnology and Bioengineering**. v.77, n.1, p.8-19, 2002.
2. AKIYAMA, K., TAKASE, M., HORIKOSHI, K. and SHIGEO, O. Production of Galactooligosaccharides from Lactose Using a β -glucosidase from *Thermus sp. Z-1*. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, v.65, n.2, p.438–441, 2001.
3. ALMEIDA, M. M., PASTORE, G. M. Galactooligossacarídeos Produção e Efeitos benéficos, **Boletim SBCTA**, v.35, n.1/2, p.12-19, 2001.
4. ALMEIDA, M. M. Síntese de Galactooligossacarídeos por β -galactosidase de *Scopulariopsis sp* a partir de lactose, **Tese de doutorado** em Ciência de Alimentos, Departamento de Ciência de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos/UNICAMP, 2003.
5. BERGER, J. L., LEE, B. H., LACROIX, C. Oligosaccharides synthesis by free and immobilized β -galactosidases from *Thermos aquaticus* YT-1. **Biotechnology Letters**. v. 17, n.10, p. 1077-1080, 1995.
6. BOON, M. A., JANSSEN, A. E. M., RIET, K. VAN'T. Effect of temperature and enzyme origin on the enzymatic synthesis of oligosaccharides. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 26, p.271–281, 1999.
7. BROUNS, F., VERMEER, C. Functional food ingredients for reducing the risks of osteoporosis. **Trends in Food Science & Technology**. v. 11, p.22–33, 2000.
8. CARABIN I. G., FLAMM W. G. Evaluation of safety of inulin and oligofructose as dietary fiber. **Regulatory Toxicology Pharmacology**, v.30, p.268–82, 1999.
9. CHIM, H. E.; MUYS, T.; DUKKUM, W.; SCHAASMA, G. Oligofructose stimulates calcium absorption in adolescents. **The American Journal Clinical Nutrition**. v.69, p.544–548, 1999.
10. CHOCKCHASAWASDEE, S., ATHANASOPOULOS, V. I., NIRANJAN, K. RASTALL, R. A. Synthesis of Galacto-oligosaccharide from lactose using β -

- galactosidase from *kluveromyces lactis*: studies on Membrane-Fitted Bioreactors. **Biotechnology and Bioengineering**. v. 89, n.4, p.434–443. 2005.
11. CRITTENDEN, R. G., PLAYNE, M. J. Production, properties and applications of food-grade oligosaccharides. **Trends in Food Science & Technology**. v.7, n.11, p.353–361, 1996.
12. CURDA L. RUDOLFOVA, J., STETINA, J., DRYAK, B. Dried buttermilk containing galactooligosaccharides—process layout and its verification. **Journal of Food Engineering**, 2005. (Print in process)
13. GAUR, R., PANT, H., JAIN, R., KHARE, S. K. Galacto-oligosaccharide synthesis by immobilized *Aspergillus oryzae* β -galactosidase. **Food Chemistry**, 2005. (in press).
14. GOPAL, P. K., PRASAD, J. GILL, H. S. Effects of the consumption of *Bifidobacterium lactis* HN019 (DR10TM) and galacto-oligosaccharides on the microflora of the gastrointestinal tract in human subjects. **Nutrition Research**. v. 23, p.1313–1328, 2003.
15. HSU, C. A., YU, R. C., CHOU, C. C. Production of β -galactosidase by Bifidobacteria as influenced by various culture conditions. **International Journal of Food Microbiology**. v.104, n.2, p.197–206, 2005.
16. ISHIKAWA, E., SAKAI, T., IKEMURA, H., MATSUMOTO, K., ABE, H. Identification, Cloning, and Characterization of a *sporobolomyces simularis* β -galactosidase-like Enzyme Involved in Galacto-Oligosaccharide Production. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.99, n.4, p.331–339, 2005.
17. IWASAKI, K. MISUTOSHI, N., NAKAO, S. Galacto-oligosaccharide production from lactose by an enzymic batch reaction using by β -galactosidase. **Process Biochemistry**. v.31, n.1, p.69-76, 1996.
18. KAJIWARA, S., GANDHI, H., USTUNOL, Z. Effect of honey on the growth of and acid production by human Intestinal *Bifidobacterium* spp.: An *in vitro* commercial oligosaccharides and inulin. **Journal of Food Protection**, v.65, n.1, p.214–218, 2002 .

19. LÓPEZ-LEIVA, M., GUZMAN, M. Formation of oligosaccharides during enzymic hydrolysis of milk whey permeates. **Process Biochemistry**. v.30, n.8, p.757-762, 1995.
20. LUND, B. M., WYATT, G. M. The nature or reducing compounds formed from sucrose by *Erwinia carotovora* var. atroseptica. **Journal of General Microbiology**, v.78, p.331–336, 1973.
21. MACFARLANE, G. T.; CUMMINGS, J. H. Probiotics and prebiotics: can regulating the activities of intestinal bacteria benefit health? **Education and debate**, v.318, p. 999-1003, 1999.
22. MORO, G.; MINOLI, I.; MOSCA, M. FANARO, S. JELINEK, J.; STAHL, B.; BOEHM, G. Dosage-Related bifidogenic effects of galacto- and fructooligosaccharides in formula-Fed term infants. **Journal of Pediatric Gastroenterology & Nutrition**. v.34, n.3, p.291–295, 2002.
23. MWENYA, B.; SANTOSO, B.; SAR, C.; GAMO, Y.; KOBAYASHI, T.; ARAI, I.; TAKAHASHI, J. Effects of including β -4 galacto-oligosaccharides, lactic acid bacteria or yeast culture on methanogenesis as well as energy and nitrogen metabolism in sheep. **Animal Feed Science and Technology**, v.115 p.313–326, 2004.
24. NAKAKUKI, T. Present status and future of functional oligosaccharide development in Japan. **Pure and Applied Chemistry** v.74, n.7, p.1245–1251, 2002.
25. NAKANO, H. Recent Japanese development in the enzymatic production and application of oligosaccharides, presented no Seminar on enzyme and bacterial technology, Campinas, **Japan International Cooperation Agency**, [s.d.] 1998.
26. NAKAO, M., HARADA, M., KODAMA, Y., NAKAYAMA, T., SHIBANO, Y., AMACHI, T. Purification and characterization of a thermostable β -galactosidase with high transgalactosylation activity from *Saccharopolyspora rectivirgula*. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v.40, p.657-663, 1994.
27. OHTSUOKA, K., BENNO, Y., ENDO, K., UEDA, H., OZAWA, O., UCHIDA, T., MITSUOKA, T. Effects of 4'-galactosyl-lactose intake on human fecal flora. **Bifidus**. v.2, p.143-149, 1989.

- 28.OKU, T.; NAKAMURA, S. Digestion, absorption, fermentation, and metabolism of function sugar substitutes and their available energy. **Pure and Applied Chemistry**, v.74, n.7, p.1253–1261, 2002.
- 29.ONISHI, N., TANAKA, T. Purification and properties of a novel thermostable galacto-oligosaccharide producing β -galactosidase from *Sterigmatomyces elviae* CBS8119. **Applied and Environmental Microbiology**. v.61, p.4026-4030, 1995.
- 30.ONISHI, N., KIRA, I., YOKOZEKI, K. Galacto-oligosaccharide production from lactose by *Sirobasidium magnum* CBS6803, **Letters in Applied Microbiology**, v.23, p.253–256, 1996.
- 31.OUWEHAND, A. C.; DERRIEN, M.; VOS, WILLEM.; TIJHONEN, k.; RAUTONEN, N., 2005. Prebiotics and other microbial substrates for gut functionality, **Current Opinion in Biotechnology**, v.16, p.212–217, 2005.
- 32.PASTORE, G. M. Produção, purificação, estudos das propriedades e aplicação da β -galactosidase de *Scopulariopsis* sp. **Tese de doutorado em Ciência de Alimentos**, Departamento de Ciência de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola da Universidade Estadual de Campinas, 1982.
- 33.PASTORE,G. M., PARK,Y. K. Screening of high β -galactosidase producing fungi and characterizing the hydrolysis properties of a selected strain, **Journal Food Science**, v.44, n.6, p.1577–1579, 1979.
- 34.PÉREZ-CONESA, D., LÓPEZ, G; ROS, G.; ABELLÁN, P. HARTEMINK, R.; Faecal microbiota changes with the consumption of follow-up formulas containing *Bifidobacterium* spp. and/or galactooligosaccharides by rats and a follow-up infant formula containing *Bifidobacterium* spp. by human infants. **Journal of Food Science**. v.71, n.1, p.M7-M13, 2006.
- 35.REDDY, B. S. Possible mechanisms by which pro- and prebiotics influence colon carcinogenesis and tumor growth. **The Journal of Nutrition**. v.129, p.1478S–1482S, 1999.
- 36.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.
37. 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.
38. SANTIAGO, P. A., MARQUEZ, L. D. S., CARDOSO, V. L. and RIBEIRO, E. J. Estudo da produção de β -galactosidase por fermentação de soro de queijo com *kluyvoromyces marxinus*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.24, n.4, p.567–572, 2004.
39. SAKO, T., MATSUMOTO, K., TANAKA, R. Recent progress on research and applications of non-digestible galacto-oligosaccharides, **International Dairy Journal**. v.9, p.69-80, 1999.
40. SHIN, H., PARK, J., YANG, J. Continuous production of galacto-oligosaccharides from lactose by *Bullera singularis* β -galactosidase immobilized in chitosan beads. **Process Biochemistry**. v.33, n.8, p.787-792, 1998.
41. TOMAOMATSU, H. Health effects of oligosaccharides. **Food Technology**. v. 48, n.10, p.61–65, 1994.
42. VAN DOKKUM W, WEZENDONK B, SRIKUMAR T. S., VAN DEN HEUVEL EG. Effect of nondigestible oligosaccharides on large-bowel functions, blood lipid concentrations and glucose absorption in young healthy male subjects. **European Journal of Clinical Nutrition**. v.53, p.1–7, 1999.
43. WALLENFELS, K.; MALHOTRA, O. P. Galactosidase. **Advances Carbohydrate Chemistry**. v.16, p.239-298, 1961.