

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

**SÍNTESE DE GALACTOOLIGOSSACARÍDEOS POR β -
GALACTOSIDASE DE *Scopulariopsis* sp A PARTIR DA LACTOSE**

MARECI MENDES DE ALMEIDA
Mestre em Bioquímica

Profa. Dra. GLÁUCIA MARIA PASTORE
Orientadora

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos, da Universidade Estadual de Campinas, para a obtenção do título de Doutor em Ciência de Alimentos.

Campinas - SP
Agosto/2003

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA F.E.A. – UNICAMP β

Almeida, Mareci Mendes de
Al64s Síntese de galactooligossacarídeos por β -
galactosidase de *Scopulariopsis* sp a partir da lactose /
Mareci Mendes de Almeida. – Campinas, SP: [s.n.], 2003.

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

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

BANCA EXAMINADORA

Tese defendida e aprovada em _____ de _____ de 2003, pela banca examinadora constituída pelos professores:

Profa. Dra. Gláucia Maria Pastore
Orientadora

Profa. Dra. Helena Teixeira Godoy
DCA/FEA

Profa. Dra. Hélia Harumi Sato
DCA/FEA

Prof. Dr. Cesar Costapinto Santana
FEQ/UNICAMP

Prof. Dr. Celio Kenji Miyasaka
DEPAN/FEA

Profa. Dra. Hilary Castle de Menezes
DTA/FEA

Profa. Dra. Maria Helena Andrade Santana
FEQ/UNICAMP

**À DEUS,
Pela infinita bondade,**

**Aos meus pais e irmãos,
pelo amor e paciência**

*Ao Carlos Alberto,
Júlia,
Com muito amor e carinho,*

Dedico

AGRADECIMENTOS

À professora Gláucia, M. Pastore, pelo ingresso no doutorado e orientação.

À coordenação do Curso de Ciência de Alimentos, pelo apoio e colaboração sempre demonstrados.

À professora Hélia H. Sato pelo carinho, apoio e disponibilidade em todos os momentos.

A todos os amigos do laboratório de Bioquímica de Alimentos, em especial a Margarida, Luciana Liboni, Hermelinda, Márcia, Cristina, Biba, Luciana Ferracini, Severino, Cláudio, Júlio, Alice, Cristina, Luciana Bittar, Haroldo, Luciana Fleuri, pelo companheirismo, carinho e apoio, tornando o cotidiano alegre e agradável.

Aos técnicos do laboratório de Bioquímica de Alimentos, Dora, Guilherme, pelo carinho e assistência e em especial a Bia e Eliane, pelo apoio e amizade, meus sinceros agradecimentos.

A todos os professores da FEA, pelo empréstimo de materiais e equipamentos

À equipe da Biblioteca da FEA, pela colaboração prestada.

Ao CNPq pelo suporte financeiro durante o desenvolvimento do trabalho.

À Universidade Estadual de Ponta Grossa – PR, pela liberação.

Àqueles que não foram citados, mas de alguma forma contribuíram para a realização desta tese.

ÍNDICE GERAL

LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELAS	xiv
RESUMO	xvii
SUMMARY	xix
INTRODUÇÃO	1
OBJETIVOS	3

CAPÍTULO 1

GALACTOOLIGOSSACARÍDEOS – PRODUÇÃO E EFEITOS BENÉFICOS..	5
RESUMO	5
SUMMARY	5
1. INTRODUÇÃO	5
2. GALACTOOLIGOSSACARÍDEOS	8
3. β -GALACTOSIDASE	11
4. EFEITOS BENÉFICOS DOS GOS	15
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	18
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	19

CAPÍTULO 2

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE β - GALACTOSIDASE DE <i>Scopulariopsis sp</i> COM ATIVIDADE DE TRANSGALACTOSILAÇÃO	27
RESUMO	27
SUMMARY	27
1. INTRODUÇÃO	28
2. MATERIAL E MÉTODOS	29
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
4. CONCLUSÕES	53

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
-------------------------------------	----

CAPÍTULO 3

PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA β -GALACTOSIDASE

DE <i>Scopulariopsis</i> sp	59
RESUMO.....	59
SUMMARY	59
1. INTRODUÇÃO	60
2. MATERIAL E MÉTODOS	64
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	67
4. CONCLUSÕES	88
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89

CAPÍTULO 4

PRODUÇÃO DE GALACTOOLIGOSSACARÍDEOS POR β - GALACTOSIDASE DE *Scopulariopsis* sp.....

RESUMO	95
SUMMARY	95
1. INTRODUÇÃO	96
2. MATERIAL E MÉTODOS	97
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	99
4. CONCLUSÕES	115
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	117

CAPÍTULO 5

SÍNTESE DE GALACTOOLIGOSSACARÍDEOS POR β - GALACTOSIDASE DE *Scopulariopsis* sp UTILIZANDO METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA

RESUMO.....	121
SUMMARY.....	121

1. INTRODUÇÃO	122
2. MATERIAL E MÉTODOS	123
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	125
4. CONCLUSÕES	142
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	143
CONCLUSÕES FINAIS	149
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	151

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 – Processo de produção industrial de galactooligossacarídeos.....	10
Figura 1.2 – Mecanismo proposto para β -galactosidase.....	13
Figura 2.1 – Fotografia de <i>Scopulariopsis</i> sp por microscopia eletrônica de varredura, material fixado com glutaraldeído e OsO ₄ , com aumento de 5000x	29.
Figura 2.2 – Produção de β -galactosidase por fermentação semi-sólida em meio farelo de trigo à 30°C por 15 dias.....	35
Figura 2.3 – Curvas de crescimento de <i>Scopulariopsis</i> sp por fermentação submersa em meios contendo glicose ou lactose como fonte de carbono, em pH 5,5 à 30°C por 10 dias.....	35.
Figura 2.4 – Efeito do pH na atividade de β -galactosidase de <i>Scopulariopsis</i> sp sobre os substratos ONPG e lactose à 60°C	39
Figura 2.5 – Efeito da temperatura na atividade de β -galactosidase de <i>Scopulariopsis</i> sp sobre o substrato ONPG em pH 5,0 e sobre o substrato lactose em pH 5,5.....	41
Figura 2.6 – Efeito do pH na estabilidade de β -galactosidase de <i>Scopulariopsis</i> sp após 24 horas de incubação à 40°C	43
Figura 2.7 – Efeito da temperatura na estabilidade de β -galactosidase de <i>Scopulariopsis</i> sp após 48 horas de incubação em pH 5,0, em diferentes tempos, e atividade enzimática medida à 60°C em pH 5,0 por 15 minutos, utilizando ONPG como substrato.....	45
Figura 2.8 – Efeito da concentração de lactose em % (p/v) na produção de galactooligossacarídeos utilizando β -galactosidase de <i>Scopulariopsis</i> sp. Cromatografia de carboidratos em papel tendo como fase móvel acetato de etila, álcool isopropílico (6:3:1) e revelador difenilamina-anilina-ácido fosfórico	47

Figura 2.9 – Efeito do tempo de reação na produção de galactooligossacarídeos a partir de solução de lactose a 35% (p/v) utilizando da β -galactosidase de <i>Scopulariopsis</i> sp. Cromatografia de carboidratos em papel, tendo como fase móvel acetato de etila, álcool isopropílico (6:3:1) e revelador difenilamina-anilina-ácido fosfórico.	51
Figura 3.1 – Perfil cromatográfico da purificação da β -galactosidase de <i>Scopulariopsis</i> em coluna SP-Sepharose.	69
Figura 3.2 – Perfil cromatográfico da purificação da β -galactosidase de <i>Scopulariopsis</i> em coluna Sephacryl S-200	69
Figura 3.3 –SDS-PAGE das preparações enzimáticas durante as etapas de purificação da β -galactosidase. (1) extrato bruto. (2) preparação enzimática obtida por fracionamento com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a 80% de saturação. (3) preparação enzimática purificada por cromatografia em coluna de SP-Sepharose. (4) preparação enzimática purificada por cromatografia em coluna de Sephacryl S-200; (5) marcadores de PM em KDa	71
Figura 3.4 – Curva padrão para determinação de peso molecular em coluna de gel Sephacryl S-200.....	73
Figura 3.5 – Superfície de resposta do efeito do pH e temperatura na atividade da β -galactosidase de <i>Scopulariopsis</i> sp	77
Figura 3.6 – Superfície de resposta do efeito do pH e temperatura na estabilidade de β -galactosidase de <i>Scopulariopsis</i> sp	81
Figura 3.7 – Efeito da concentração do ONPG na atividade da β -galactosidase de <i>Scopulariopsis</i> sp	84
Figura 3.8 – Determinação gráfica dos valores de K_m e V_{max} da β -galactosidase de <i>Scopulariopsis</i> sp, de acordo com Lineweaver-Burk	84
Figura 4.1 – Efeito da concentração de β -galactosidase e do tempo de reação na síntese de 4'galactosil-lactose, utilizando solução de lactose a 40% (p/v) em pH 5,5 à 45°C	101

Figura 4.2 – Efeito da concentração de β -galactosidase na produção de 4'galactosil-lactose, glicose e galactose a partir de solução de lactose 40% (p/v) em pH 5,5 à 45°C	101
Figura 4.3 – Efeito do pH e do tempo de reação na síntese de 4'galactosil-lactose a partir de solução de lactose 20% (p/v) à 45°C, utilizando 6U/mL de β -galactosidase.....	105
Figura 4.4 – Efeito do pH na produção de 4'galactosil-lactose, glicose e galactose a partir de solução de lactose 20% (p/v) à 45°C	105
Figura 4.5 – Efeito da temperatura e do tempo de reação na síntese de 4'galactosil-lactose a partir de solução de lactose 40% (p/v) em pH 5,5, utilizando 6U/mL de β -galactosidase	107
Figura 4.6 – Efeito da temperatura na produção de 4'galactosil-lactose, glicose e galactose a partir de solução de lactose 40% (p/v) em pH 5,5	109
Figura 4.7 – Cinética de produção de galactooligossacarídeo. Utilizando lactose a 40% (p/v) em pH 5,5 e 6 U/mL de β -galactosidase	113
Figura 5.1 - Efeito do pH e da temperatura na produção de 4'galactosil-lactose a partir de lactose 40% (p/v), utilizando 6U/mL de β -galactosidase. (a) superfície de resposta, (b) área de contorno	129
Figura 5.2 – Efeito da temperatura e da concentração de β -galactosidase na produção de 4'galactosil-lactose a partir de lactose 40% (p/v) em pH 6,0. (a) superfície de resposta, (b) área de contorno	131
Figura 5.3 - Efeito do pH e da concentração de β -galactosidase na produção de 4'galactosil-lactose a partir de lactose 40% (p/v) à 40°C. (a) superfície de resposta, (b) área de contorno	133
Figura 5.4 – Perfil cromatográfico de carboidratos em coluna Supelcogel TM Ca, após 24 horas de reação a partir de solução de lactose 40% (p/v) em pH 7,68 à 40°C, utilizando 6U/mL de β -galactosidase de <i>Scopulariopsis</i> sp	135

Figura 5.5 – Perfil cromatográfico de carboidratos em coluna Supelcogel™ Ca, após 24 horas de reação a partir de solução de lactose 40% (p/v), utilizando 6U/mL de β -galactosidase de <i>Scopulariopsis</i> sp	137
Figura 5.6 - Perfil cromatográfico da amostra obtida do fracionamento dos açúcares em coluna de carvão ativado:sílica eluídos com etanol 15%	139

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 – Oligossacarídeos com funções bifidogênicas.....	9
Tabela 2.1 – Atividade de β -galactosidase após precipitação com diferentes agentes.....	37
Tabela 3.1 – Fatores e níveis estudados no planejamento experimental fatorial de 2 níveis para pH e temperatura ótimos.....	66
Tabela 3.2 – Fatores e níveis estudados no planejamento experimental fatorial de 2 níveis para pH e temperatura de estabilidade	66
Tabela 3.3 – Purificação parcial da β -galactosidase de <i>Scopulariopsis</i> sp	67
Tabela 3.4 – Matriz dos experimentos para planejamento experimental fatorial de dois níveis e a atividade de β -galactosidase em pH e temperatura ótima de atividade e de estabilidade	74
Tabela 3.5 - Efeito do pH e temperatura na atividade de β -galactosidase	74
Tabela 3.6 – Análise de variância (ANOVA) para pH e temperatura ótima de atividade	75
Tabela 3.7 - Efeito do pH e temperatura de estabilidade na atividade de β -galactosidase	79
Tabela 3.8 – Análise de variância (ANOVA) para efeito do pH e temperatura na estabilidade da β -galactosidase	81
Tabela 3.9 – Efeito de diferentes íons metálicos e inibidores na atividade da β -galactosidase de <i>Scopulariopsis</i> sp	86
Tabela 5.1 – Fatores e níveis estudados no planejamento experimental fatorial de 2 níveis para formação de 4'galactose.....	124
Tabela 5.2 – Matriz dos experimentos para planejamento experimental fatorial de dois níveis e a porcentagem de área de 4'galactose formados.....	126

Tabela 5.3 – Efeito da concentração da enzima, pH e temperatura na síntese de galactooligossacarídeos	127
Tabela 5.4 - Análise de variância (ANOVA) para formação de 4'gal-lactose.....	128

RESUMO

Os galactooligossacarídeos são produzidos a partir da lactose por ação da β -galactosidase com atividade de transgalactosilação. São carboidratos não digeríveis, sendo resistentes às enzimas digestivas e fermentados por bifidobactérias. Os benefícios da ingestão de galactooligossacarídeos são de elevar a população de bifidobactérias no cólon e por efeito antagônico, suprimir a atividade de bactérias putrefativas e reduzir a formação de produtos tóxicos por fermentação.

O microrganismo *Scopulariopsis* sp acumulou grande quantidade de β -galactosidase por fermentação semi-sólida e a enzima foi produzida constitutivamente. A enzima obtida foi fracionada com sulfato de amônio, acetona e etanol, sendo a precipitação com sulfato de amônio a que apresentou melhores resultados. O extrato enzimático foi caracterizado bioquimicamente, apresentando um pH ótimo de 4,5 e temperatura ótima de 65°C, e a estabilidade enzimática foi em pH 5,0 e 50°C. A enzima apresentou atividade de transgalactosilação quando avaliada por cromatografia de papel.

A β -galactosidase extracelular de *Scopulariopsis* sp foi semi-purificada e caracterizada. A enzima foi semi-purificada 13 vezes com um rendimento de aproximadamente 14%. O peso molecular da enzima foi estimado por filtração em gel em torno de 98 KDa. Algumas características da enzima foram determinadas usando *o*-nitrofenil- β -galactopiranosídeo (ONPG) como substrato. O pH e temperatura ótimos de atividade foram em torno de 4,5 e 60°C, respectivamente. A enzima foi estável em 40°C por 24 horas e pH 5,0. Os valores de K_m e V_{max} para ONPG foram 2,28mM e 123 μ moles/mL/min, respectivamente. Os cátions Fe^{+2} , Fe^{+3} e Mn^{+2} ativaram a enzima e N-bromosuccinimida inibiu sua atividade.

A atividade de transgalactosilação da β -galactosidase foi avaliada por cromatografia líquida de alta eficiência. A temperatura ótima para atividade de galactosiltransferase foi entre 35 e 45°C e o efeito do pH foi mínimo em alta concentração de lactose; a concentração de enzima para síntese de GOS foi 4-6

U/mL. Quando uma solução de lactose a 40% (p/v) em 0,1 M de tampão acetato de sódio pH 4,5 a 45°C foi incubada com 6 U/mL de β -galactosidase, a enzima converteu 30% da lactose em galactooligossacarídeos.

Foi utilizado planejamento fatorial completo de 2 níveis para estudar o efeito da enzima (4,0 e 8,0 U/mL), pH (5,0 e 7,0) e temperatura (35°C e 45°C) na formação enzimática de galactooligossacarídeos a partir da lactose. Uma diminuição da concentração de enzima e temperatura, e um aumento do valor de pH resultou uma maior produção de galactooligossacarídeos. O produto obtido em maior quantidade foi identificado com 4'galactosil-lactose por cromatografia líquida de alta eficiência.

SUMMARY

Galactooligosaccharides are produced from lactose by the action of β -galactosidases which have transgalactosylation activity. They are non-digestible carbohydrates, which are resistant to gastrointestinal digestive enzymes and are fermented by bifidobacteria. The benefits of galactooligosaccharide ingestion arise from increased population of bifidobacteria in the colon which, by their antagonistic effect, suppress the activity of putrefactive bacteria and reduce the formation of toxic fermentation products.

The strain of *Scopulariopsis* accumulated large amounts of the β -galactosidase by semi-solid fermentation and the enzyme was produced constitutively. The enzyme obtained was fractionated with ammonium sulphate, acetone and ethanol, the precipitation with ammonium sulphate showed better results. The enzymatic extract was biochemically characterized, showing an optimum pH of 4.5 and optimum temperature of 65°C, and the enzymatic stability was at pH 5.0 and 50°C. The enzyme showed transgalactosylation activity, when it was evaluated by paper chromatography.

Extracellular β -galactosidase from *Scopulariopsis* sp was semi-purified. The enzyme was a semi-purified 13-fold with a yield of about 14%. The molecular weight of the enzyme was estimated to be about 98 KDa by gel filtration. Some enzyme characteristics were determined using *o*-nitrophenyl- β -galactopyranoside (ONPG) as substrate. The pH and temperature optimum of the activity were about 4.5 and 60°C, respectively. The enzyme was stable at 40°C for 24 hours and pH 5.0. The K_m and V_{max} values for ONPG were 2,28mM and 123 μ moles/mL/min, respectively. The cations Fe^{+2} , Fe^{+3} and Mn^{+2} activated the enzyme and N-bromosuccinimide inhibited activity.

Transgalactosylation activity of the β -galactosidase was evaluated by high pressure liquid chromatography. The optimum temperature for galactosyltransferase activity was in the range of 35 to 45°C and the pH effect was minimal at high lactose concentration; the enzyme concentration for GOS

synthesis was 4-6 U/mL. When 40% (w/v) lactose solution (in 0.1M sodium acetate buffer, pH 4.5, 45°C) was incubated with 6 U/mL of β -galactosidase, the enzyme converted 30% of the lactose in galactooligosaccharides.

Two-level full-factorial design experiments were designed to study effects of enzyme (4.0 and 8.0 U/mL), pH (5.0 and 7.0) and temperature (35°C e 45°C) on enzymatic formation of galactooligosaccharides from lactose. A decrease of enzyme concentration and temperature and an increase of pH value resulted in a higher galactooligosaccharides production. The major product was identified as 4'galactosyl-lactose by high performance liquid chromatography.

INTRODUÇÃO

Os galactooligossacarídeos (GOS) são compostos por moléculas de galactose ligadas à lactose, sendo formados de tri a hexassacarídeos com 2-5 unidades de galactose (SAKO et al., 1999).

A produção de galactooligossacarídeos ocorre por via bioquímica, quando a β -galactosidase age como uma enzima hidrolítica e também como uma enzima de condensação, neste caso denominada de reação de transgalactosilação (PRENOSIL et al., 1987).



A quantidade e os tipos de GOS produzidos dependem de diversos fatores, como: a fonte da enzima, a natureza e a concentração do substrato, o processo de obtenção, a composição do meio, e o grau de conversão da lactose (EKHART e TIMMERMANS, 1996).

Os galactooligossacarídeos são considerados alimentos funcionais e são licenciados como ingredientes de alimentos FOSHU (food for specified health use), termo criado pelo Ministério da Saúde do Japão.

São preconizados como GRAS (generally recognized as safe) devido ao fato de serem componentes do leite humano e tradicionalmente de iogurtes, sendo produzidos no intestino por bactérias produtoras de β -galactosidase a partir da lactose ingerida. Não apresentam toxicidade e somente é conhecido como efeito adverso, diarreia 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).

Os GOS são considerados fatores bifidogênicos, definidos como compostos que não são metabolizados pelo hospedeiro e alcançam o intestino para serem metabolizados por bifidobactérias. A suplementação da dieta com estes 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 (MODLER, 1994).

As bifidobactérias têm sido consideradas as mais importantes no organismo de bebês. Enquanto que os lactobacilos e *Escherichia coli* são mais numerosos em adultos, porém as bifidobactérias também constituem um dos principais organismos na flora intestinal de adultos, e a sua redução ou desaparecimento no intestino humano indica um estado “não saudável” (MITSUOKA, 1990).

A contagem de bifidobactérias diminui com o avanço da idade, como um resultado da diminuição da secreção de sucos gastrointestinais. Esta diminuição tem sido postulada como uma importante causa de perda de imunidade e doenças em adultos, como câncer. O estresse mental também altera a microflora intestinal diminuindo drasticamente as bifidobactérias e aumentando as bactérias deterioradoras.

Assim a ingestão de GOS promove a proliferação de bifidobactérias e redução das bactérias deterioradoras, consequentemente ocasionando efeitos benéficos para a saúde humana como: a redução de metabólicos tóxicos e com isto uma desintoxicação do fígado; prevenção de diarreias patogênicas, devido a produção de ácidos graxos de cadeia curta pelas bifidobactérias; auxílio em processos de constipação, por estímulo dos movimentos peristálticos do intestino; efeito anti-cancerígeno devido um aumento da imunidade celular; produção de nutrientes, pois as bifidobactérias produzem vitaminas B₁, B₂, B₆, B₁₂, ácido nicotínico e ácido fólico; aumento da tolerância à lactose, absorção de cálcio e digestibilidade (TOMOMATSU, 1994); e redução dos riscos de osteoporose (BROUNS e VERMEER, 2000).

OBJETIVOS

- ➔ Estudar as condições de produção da enzima β -galactosidase.
- ➔ Determinar o melhor método de fracionamento de proteínas para extração da enzima β -galactosidase.
- ➔ Caracterizar parcialmente a enzima bruta, quanto ao pH e temperatura ótimo de atividade e de estabilidade.
- ➔ Comprovar se a β -galactosidase de *Scopulariopsis* sp apresenta atividade de transgalactosilação.
- ➔ Purificar a β -galactosidase em FPLC (Fast Protein Liquid Chromatograph) e caracterizar bioquimicamente.
- ➔ Definir as melhores condições de pH, temperatura e concentração de enzima para produção de galactooligossacarídeos.
- ➔ Avaliar o processo de síntese de galactooligossacarídeos utilizando metodologia de superfície de resposta.

CAPÍTULO 1

GALACTOOLIGOSSACARÍDEOS – PRODUÇÃO E EFEITOS BENÉFICOS

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 são fermentados por bifidobactérias. Os benefícios da ingestão de galactooligossacarídeos são elevar a população de bifidobactérias no cólon e por efeito antagônico, suprimir a atividade de bactérias putrefativas e reduzir a formação de metabólitos tóxicos. Os galactooligossacarídeos são produzidos a partir da lactose por ação da β -galactosidase com atividade de transgalactosilação.

SUMMARY

Oligosaccharides of various types are found as in many common foods. Some of them act not only as nutrients, but also exhibit physiological activities. Galacto-oligosaccharides are non-digestible carbohydrates, which are resistant to gastrointestinal digestive enzymes and are fermented by bifidobacteria. The benefits of galacto-oligosaccharide ingestion arise from increased population of bifidobacteria in the colon which, by their antagonistic effect, suppress the activity of putrefactive bacteria and reduce the formation of toxic fermentation products. Galacto-oligosaccharides are produced from lactose by the action of β -galactosidases which have transgalactosylation activity.

1. INTRODUÇÃO

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 alimentos funcionais

(NAKANO, 1998). Eles melhoram a qualidade dos alimentos, promovendo uma modificação no “flavor” e nas características físico-químicas, e ainda apresentam propriedades benéficas para a saúde do consumidor (CRITTENDEN e PLAYNE, 1996), por exemplo, maltooligosil sacarose e palatinose previnem cáries dentárias, fruto-, xilo- e galactooligossacarídeos estimulam a atividade de *Bifidobacterium* no trato intestinal, sendo esta a principal alegação para tais produtos, de auxiliar a manter um bom desenvolvimento gastrointestinal (NAKANO, 1998).

Nos últimos anos o interesse e consumo de oligossacarídeos têm 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, estando listados entre eles os fruto- e galactooligossacarídeos. Em 1996 a lista de FOSHU compreendia um total de 58 alimentos aprovados e entre estes, 34 incorporavam oligossacarídeos em sua formulação. Os oligossacarídeos são geralmente definidos como glicosídeos que contém entre três e dez monossacarídeos, entretanto muitos dissacarídeos apresentam propriedades similares (CRITTENDEN e PLAYNE, 1996).

Devido suas propriedades físico-químicas os oligossacarídeos também podem melhorar o produto em que se encontram. São solúveis em água, levemente doces e apresentam 0,3 a 0,6 vezes a doçura da sacarose. Este baixo poder adoçante é dependente da estrutura química e massa molecular dos oligossacarídeos e da concentração de mono e dissacarídeos na mistura. O baixo poder adoçante é favorável na produção do alimento, quando a matriz com reduzida doçura é desejável para evidenciar outros “flavours”. Comparado com mono e dissacarídeos, o maior peso molecular dos oligossacarídeos promovem uma elevação da viscosidade, aumentando o corpo e a sensação do alimento na boca. Também podem ser 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 (CRITTENDEN e PLAYNE, 1996).

O principal interesse do uso dos oligossacarídeos como ingredientes nos alimentos se deve às suas propriedades fisiológicas, 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 confeitados, gomas de mascar, iogurtes e bebidas. 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 destes adoçantes.

A habilidade de muitos oligossacarídeos promoverem a proliferação das bifidobactérias no cólon tem sido muito estudada. Acredita-se que estas bactérias são importantes para a saúde e juntamente com outros microrganismos são denominadas de pró-bióticos. Os oligossacarídeos têm sido descritos como pré-bióticos (observar definições no quadro abaixo), por estimularem o crescimento da microbiota benéfica.

Pré-biótico: alimento não digerível que beneficia o hospedeiro por estimular seletivamente o crescimento e/ou a atividade das bactérias residentes no cólon intestinal.

Pró-biótico: suplemento alimentar de microrganismos que beneficia o hospedeiro por melhorar seu equilíbrio intestinal.

Ref.: (CRITTENDEN e PLAYNE, 1996)

O estabelecimento de bifidobactérias na microbiota intestinal de lactentes tem sido atribuído a presença de oligossacarídeos contendo galactose em leite humano. Assim a inclusão de galactooligossacarídeos como ingredientes de alimentos pré-bióticos tem tido considerável interesse comercial, e várias companhias estão envolvidas com a produção destes. Os galactooligossacarídeos são produzidos a partir da lactose através da atividade da enzima β -galactosidase (E.C. 3.2.1.23).

2. GALACTOOLIGOSSACARÍDEOS

Os carboidratos que participam da dieta são classificados pelo peso molecular e pelo grau de polimerização (GP) em monossacarídeos, oligossacarídeos (GP=2-10) e polissacarídeos (GP>10). E também podem ser classificados baseados nas propriedades fisiológicas de digeríveis ou não digeríveis, havendo três principais tipos de carboidratos não digestíveis: os polissacarídeos não amídicos, os amidos resistentes e os oligossacarídeos não digeríveis [NDOs – non-digestible oligosaccharides] (VORAGEN, 1998).

Os galactooligosacarídeos (Gal-OS) estão incluídos entre os NDOs e estão licenciados como ingredientes de alimentos FOSHU pelo Ministério da Saúde do Japão. A produção estimada de NDOs no mundo em 1995 foi de 85000 toneladas (tabela 1.1), mais da metade foi consumida no Japão com valor aproximado de 10 bilhões de yenes (SAKO et al., 1999).

Tabela 1.1 – Oligossacarídeos com funções bifidogênicas

Nome	Estrutura molecular ^a	Produção em 1995 (t) ^b
Lactulose	Gal-Frut	20000
Lactosacarose	Gal-Glic-Frut	1600
Rafinose	Gal-Glic-Frut	200 ^c
Galactooligossacarídeos	(Gal)_n-Glic	15000
Frutooligossacarídeos	(Frut) _n -Glic	12000
Oligossacarídeo de soja	(Gal) _n -Glic-Frut	2000
Isomaltoligossacarídeos	(Glic) _n	11000
Xilooligossacarídeos	(Xil) _n	300
Palatinose oligossacarídeos	(Glic-Frut) _n	5000
Glicosilsacarose	(Glic) _n -Frut	4000
Maltooligossacarídeos	(Glic) _n	10000
Ciclodextrinas	(Glic) _n	4000
Gentiooligossacarídeos	(Glic) _n	400
Total		85300

^aGal: galactose; Glic:glucose, Frut:frutose; Xil:xilose

^bde CRITTENDEN e PLAYNE, 1996

^cvalor avaliado somente no Japão

Fonte: SAKO et. al., 1999

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

Nos Gal-Os, 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 2-5 unidades de galactose, é muito comum encontrar dissacarídeos transgalactosilados, consistindo em galactose e glucose com ligações β -glicosídicas diferentes de lactose ou com duas unidades

de galactose, estes dissacarídeos são considerados NDOs desde que tenham características fisiológicas similares a dos Gal-OS (SAKO et al., 1999).

A figura 1.1 mostra um processo industrial para Gal-OS. A lactose usada como substrato na reação é geralmente purificada de soro de leite de vaca. E os principais produtos são trissacarídeos, 4'- ou 6'-galactosil-lactose e poucos oligossacarídeos consistindo de quatro ou mais unidades de monossacarídeos, além de grande quantidade de dissacarídeos transgalactosilados (MATSUMOTO et al., 1990).

Comercialmente os Gal-OS são misturas de várias espécies moleculares de oligossacarídeos (mais que 55%), lactose (~20%), glucose (~20%) e uma pequena quantidade de galactose, são comercializados na forma líquida ou em pó.

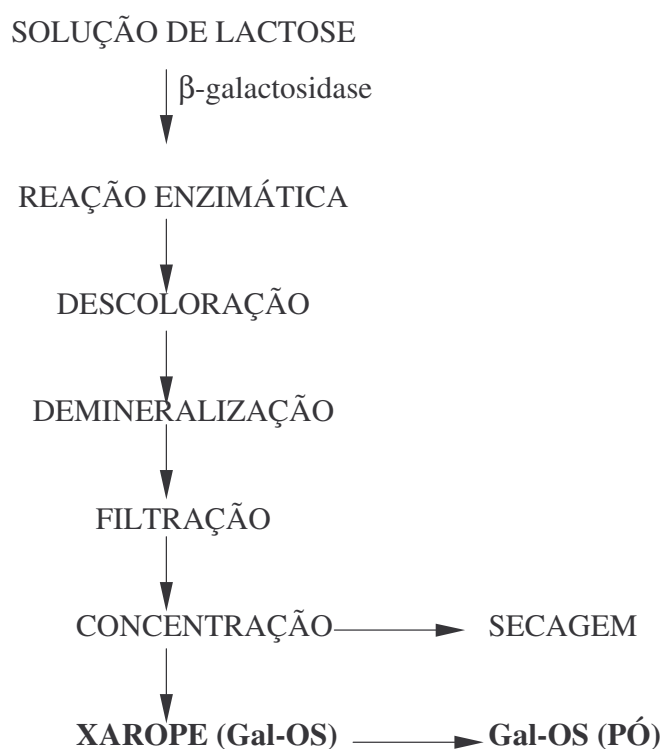


Figura 1.1 – Processo de produção industrial de galactooligossacarídeos (MATSUMOTO et al., 1990)

Um produto de marca japonesa (Oligomate 55) contém um mínimo de 55% de 4'-Gal-OS incluindo dissacarídeos transgalactosilados no material sólido. A doçura deste produto é aproximadamente 35% da sacarose, em solução é levemente mais viscosa que xarope de frutose (HFCS-high fructose corn syrups) e tem pressão osmótica similar a da solução de sacarose, na mesma concentração. Ainda apresenta a mesma atividade de água da sacarose e tem maior capacidade de retenção que HFCS, podendo agir como preservativo mantendo a estabilidade do produto. São estáveis, permanecem inalterados após tratamento a 160°C por 10 min e pH neutro e a 120°C por 10 min em pH 3,0 ou 100°C por 10 min em pH 2,0, enquanto que nestas condições mais da metade da sacarose é degradada (SAKO et al., 1999). É ainda bastante estável por longo tempo de estocagem a temperatura ambiente ou condições acídicas, sendo sugerido que a estabilidade de Gal-OS é melhor que de frutooligossacarídeos (VORAGEN, 1998).

Os galactooligossacarídeos podem ser usados como adoçantes, em produtos de leite fermentado, pães, geléias, bebidas e produtos de confeitaria. O pão é um alimento apropriado para a inclusão destes, pois durante a fermentação com a levedura e o cozimento do pão, os Gal-OS não são degradados, e auxiliam a obter um pão de excelente sabor e textura. Produtos fermentados de laticínios são outros bons exemplos de sua inclusão, leites fermentados adicionados de Gal-OS estão comercialmente disponíveis no Japão e na Europa. Alimentos infantis e alimentos especiais para idosos e hospitalizados são promissores para aumentar a aplicação de Gal-OS, pois estas pessoas são mais suscetíveis a mudanças no desenvolvimento intestinal. Assim os Gal-OS apresentam características ímpares para a utilização em alimentos industrializados, porém pesquisas científicas substanciais sobre seus efeitos biológicos são necessárias para que isto torne-se uma realidade (SAKO et al., 1999).

3. β -GALACTOSIDASE

As glicosidases, de um modo geral, são conhecidas por promoverem catálise hidrolítica, bem como reação de transferência, onde o resíduo de açúcar formando a parte glicona da molécula de substrato pode ser transferido para a

água ou outro acceptor hidroxílico, como uma outra molécula de açúcar ou álcool. Para β -galactosidase tem sido estabelecido que as reações hidrolítica, sintética e de transferência são catalisadas pela mesma enzima, estas observações podem ser explicadas se assumir que a aglicona e o acceptor ocupam a mesma posição na molécula da enzima (WALLENFELS e MALHOTRA, 1961). A β -galactosidase é uma das enzimas mais estudadas e relatada na literatura, ocorre em plantas como amêndoas, damascos, pêssegos, maçãs, bagas de café, etc., em órgão de animais como intestino, cérebro, testículo, placenta e também é produzida por uma grande quantidade de microrganismos como leveduras, fungos e bactérias, sendo esta a fonte mais aceitável para produção e aplicação industrial (RICHMOND e STINE, 1981).

A β -galactosidase de *Escherichia coli*, ML 309, foi a primeira da classe das enzimas que hidrolisam oligossacarídeos a ser obtida na forma pura e cristalina, sendo utilizada para estudar o mecanismo de ação das β -galactosidas. Na β -galactosidase o grupo ionizável no lado alcalino tem sido identificado como grupo sulfidril, baseado na inibição por metais pesados e por *p*-mercuribenzoato. O outro grupo ionizável é um grupo imidazol. No mecanismo proposto para ação da enzima o grupo sulfidril age como um ácido protonando o átomo de oxigênio glicosídico, e o grupo imidazol age como um nucleófilo e ataca o centro nucleofílico (C₁) da glicona, formando um composto intermediário com ligação covalente carbono-nitrogênio. Na remoção do grupo galactosil, o ânion sulfidril (S⁻) age como uma base para tirar o próton da água e a hidroxila formada ataca a posição do C₁, formando o novo composto [figura 1.2] (WHITAKER, 1994).

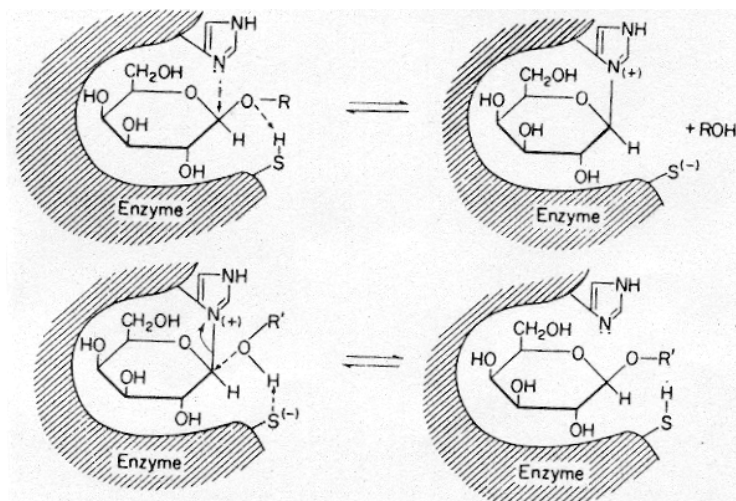


Figura 1.2 – Mecanismo proposto para β -galactosidase (WHITAKER, 1994)

Em todas as etapas da reação o produto mantém a configuração β - do carbono anomérico. A molécula da enzima é composta de várias subunidades e o número de sítios ativos por peso molecular é dependente da temperatura, a baixas temperaturas sua conformação não expõe todos os sítios ativos para o substrato (WHITAKER, 1994). Um outro mecanismo também foi proposto onde a formação do produto ocorreria apenas em uma etapa, neste caso seria necessário a existência de dois sítios similares, para a aglicona e o aceptor, respectivamente, próximos um do outro (WALLENFELS e MALHOTRA, 1961; WHITAKER, 1994). Os principais substratos utilizados para estimar a atividade de β -galactosidase são lactose e *o*-nitrofenil β -D-galactopiranosídeo, sendo liberados D-glicose e *o*-nitrofenol, respectivamente, que podem ser determinados por espectrofotometria (WALLENFELS e MALHOTRA, 1961).

Muitos pesquisadores têm purificado diversas β -galactosidases dos mais variados microrganismos e estudado sua atividade de transgalactosilação. Entre os microrganismos estudados estão *Saccharomyces fragilis* (TOBA e ADACHI, 1978), *Aspergillus oryzae* (PARK et al., 1979), *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces fragilis*, *Aspergillus niger*, (TOBA et al., 1985; PRENOSIL et al., 1987; BOON et al., 2000), *Trichoderma harzianum* (PRAKASH et al., 1989), *Bifidumbacterium bifidum* (DUMORTIER et al., 1994), *Sterigmatomyces elviae* (ONISHI et al., 1995), *Thermus aquaticus* (BERGER et al., 1995b), *Sirobasidium magnum* (ONISHI et al., 1996), *Penicillium simplicissimum* (CRUZ et al., 1999),

Rhizomucor sp (SHAIKH et al., 1999), *Bifidobacterium adolescentis* (VAN LAERE et al., 2000), *Streptococcus thermophilus* (PERRIN et al., 2000), *Lactobacillus crispatus* (KIM e RAJAGOPAL, 2000), *Penicillium chrysogenum* (NAGY et al., 2001), *Bacillus coagulans* (BATRA et al., 2002), *Bifidobacterium infantis* (HUNG e LEE, 2002), *Pseudoalteromonas* sp (FERNANDES et al., 2002).

HUBER e colaboradores (1976) fizeram um estudo da ação de β -galactosidase e do efeito da atividade de transgalactosilase usando lactose (galactosil- β -D-(1,4)-glucopiranoose) como substrato. Houve formação de galactose, glucose, alolactose (galactosil- β -D-(1,6)-glucopiranoose) e oligossacarídeos principalmente trissacarídeos. Foi observada maior formação de glucose que galactose devido ao fato de serem formados os oligossacarídeos com mais unidades de galactose. Com a continuidade da reação os oligossacarídeos e a alolactose foram hidrolisados e as concentrações de glucose e galactose tornaram-se iguais. A alolactose foi produzida em todas as concentrações de lactose estudadas, podendo sua produção ser referida como a atividade de transgalactosilase “direta”, pois tem sido proposto que inicialmente ocorre uma transferência das moléculas galactosil da posição 4 para a 6 da glucose na lactose sem liberação prévia da glucose.

Industrialmente a β -galactosidase é utilizada para romper as ligações glicosídicas da lactose, formando uma solução de glucose e galactose com leve aumento do sabor doce, mas também se tem atribuído grande importância para a atividade de síntese de oligossacarídeos (CRUZ et al., 1999), inclusive foi encontrada uma β -galactosidase de *Sterigmatomyces elviae* que apresentou alto nível de transgalactosilação e baixo nível de atividade hidrolítica, sendo favorável na bioconversão da lactose para produção de Gal-OS (ONISHI e TANAKA, 1995), porém ainda não se sabe qual a importância fisiológica para o microrganismo de produzir Gal-OS (DUMORTIER et al., 1994).

Muitos estudos científicos tem sido realizados, em diferentes condições experimentais, para obter galactooligossacarídeos com função bifidogênica (GREENBERG e MAHONEY, 1983; PRAKASH et al., 1987; DUMORTIER et al., 1994; NAKAO et al., 1994; SHIN e YANG, 1994; ONISHI e TANAKA, 1995;

BERGER et al., 1995a; IWASAKI et al., 1996; ONISHI e TANAKA, 1997; BERGER et al., 1997; SHIN et al., 1998; CRUZ et al., 1999; PERRIN et al., 2000; HUNG e LEE, 2002; ROY et al., 2002), sendo identificados por diversas técnicas como cromatografias em papel, em camada delgada, líquida de alta eficiência, gasosa e espectroscopia de ressonância magnética nuclear (BALIO e RUSSI, 1960; GORIN et al., 1964; TOBA e ADACHI, 1978; TOBA et al., 1985; PERRIN et al., 2000), estando evidente que o tipo de galactooligossacarídeo formado é dependente do microrganismo, das condições de cultivo e do sistema empregado.

4. EFEITOS BENÉFICOS DOS GALACTOOLIGOSSACARÍDEOS

As bifidobactérias são bactérias gram-positivas, estritamente anaeróbicas, sem motilidade e são habitantes naturais do intestino de animais e do homem (MODLER, 1994). São consideradas como o mais importante gênero de bactérias para a saúde humana, elas encontram-se entre 85 a 99% na flora intestinal de crianças e nos adultos passam para o terceiro ou quarto maior grupo de microrganismos, enquanto coliformes, clostrídeos e lactobacilos apresentam-se, normalmente, em torno de 15%; *Bifidobacterium infantis* e *Bifidobacterium breve* são substituídos por *Bifidobacterium adolescentis*, enquanto *Bifidobacterium longus* persistem por toda vida. São consideradas as mais importantes no organismo de bebês, enquanto lactobacilos e *Escherichia coli* são os mais numerosas em adultos, pois a contagem de bifidobactérias diminui com o avanço da idade, como um resultado da diminuição da secreção de sucos gastrointestinais que causa a perda de imunidade e doenças como câncer (TOMOMATSU, 1994). Assim torna-se claro que bifidobactéria constitui um dos principais organismos na flora intestinal de adultos, e a sua redução ou desaparecimento no intestino humano está relacionada a um estado “não saudável” (MITSUOKA, 1990). Compostos que não são metabolizados pelo hospedeiro e alcançam o intestino para serem metabolizados por bifidobactérias são considerados fatores bifidogênicos. Essencialmente, estes compostos são carboidratos que são utilizados pelas bifidobactérias como fonte de energia.

A proliferação de bifidobactérias é estimulada por componentes glicoproteicos da *k*-caseína do colostro humano e, em menor grau, do leite materno. Frações correspondentes no leite bovino parecem não ter efeito estimulatório no crescimento das bifidobactérias. Com o passar dos anos, tanto o número como as espécies de bifidobactérias que habitam no trato intestinal se modificam e esta mudança de perfil pode estar ligada à ingestão de fatores bifidogênicos na dieta (MODLER, 1994).

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

As doses diárias efetivas de galactooligossacarídeos na forma pura são entre 2,0-2,5g, sua indigestibilidade se dá porque estes apresentam configuração β e as enzimas digestivas gastrointestinais humanas são principalmente específicas para ligações α , sendo então resistente a digestão e absorção no intestino atingindo o ceco e o cólon, onde são fermentados por bactérias. O fato dos oligossacarídeos não serem digeridos pelos sucos digestivos humanos leva a comparação destes com as fibras, e os benefícios à saúde assemelham-se aos atributos a dietas ricas em fibras. Entretanto, não apresentam os efeitos físicos destas, como aumento da viscosidade, e a contribuição ocorre devido a características fermentativas. As vantagens dos oligossacarídeos sobre as fibras são que eles requerem menores doses diárias, não causam diarreias nas doses recomendadas, são levemente adocicados, não apresentam textura e sabor desagradáveis, são completamente solúveis em água, não aumentam a

viscosidade, não ligam-se com minerais, são fisicamente estáveis e são mais fáceis de incorporar em alimentos e bebidas processados (TOMOMATSU, 1994).

Um dos produtos finais da fermentação de carboidratos por bactérias são os ácidos graxos de cadeia curta (SCFA). Estes são eficientemente absorvidos estimulando a motilidade intestinal e a absorção de sais e água. A quantidade e o tipos de SCFA produzido no cólon depende do tipo de carboidrato utilizado e da composição microbiana intestinal. Foram observadas mudanças na microbiota fecal de voluntários após a ingestão de Gal-OS, porém modificações na produção de SCFA não foram evidentes, mas estudos em animais claramente demonstraram o decréscimo de pH e aumento de SCFA. Os Gal-OS foram eficazes em aumentar a ocorrência de defecação em homens e mulheres com problemas de constipação, sendo sugerido que a produção de SCFA contribuiu para o aumento de pressão osmótica e estímulo dos movimentos peristálticos (ISHIKAWA et al., 1995). A frequência fecal foi aumentada com a ingestão de iogurte contendo 15g de Gal-OS/dia em 12 voluntários sadios (TEURI et al., 1998). Em um estudo em humanos com voluntários saudáveis, a ingestão de 4'Gal-OS em doses de 3g/dia reduziu significativamente a concentração de amônia fecal (TAKANO e MIWA, 1961) e em pacientes com hiper-amonemia associada com cirrose hepática, a administração de 6'Gal-OS (30g/dia) junto com *Bifidobacterium breve* (6.10^9 /dia) estabeleceu uma flora intestinal predominante de bifidobactérias, e o nível de amônia no sangue foi gradativamente caindo de 157 $\mu\text{g/dL}$ para o nível normal de 88 $\mu\text{g/dL}$, em três a quatro semanas (MATSUMOTO et al., 1993).

Várias enzimas bacterianas como β -glucuronidase, β -glucosidase e nitroredutase podem converter componentes pré-carcinogênicos em carcinogênicos. Estudos em humanos mostraram um decréscimo na atividade de β -glucuronidase fecal, quando consumiram 10 g/dia de Gal-OS (ISHIKAWA et al., 1995). A absorção de cálcio, em ratos, foi estimulada pela alimentação com Gal-OS, na presença de NDOs no ceco, as bactérias produziram uma maior quantidade de SCFA e outros ácidos orgânicos como ácido lático e succínico, sendo a solubilidade por cálcio aumentada (CHONAN e WATANUKI, 1995).

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

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 galactooligossacarídeos. 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.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BALLIO, A.; RUSSI, S. Chromatographic fractionation and chemical characterization of some oligosaccharides synthesized from lactose by *Penicillium chrysogenum* thom. **Journal Chromatography**. v. 4, p.117-129, 1960.

BATRA, N.; SINGH, J.; BANERJEE, U. C.; PATNAIK, P. R.; SOBTI, R. C. Production and characterization of a thermostable β -galactosidase from *Bacillus coagulans* RCS3. **Biotechnology Applied Biochemistry**. v. 36, part1, p. 1-6, 2002.

BERGER, J.L.; LEE,B.H.; LACROIX, C. Oligosaccharides synthesis by free and immobilized β -galactosidases from *Thermus aquaticus* YT-1. **Biotechnology Letters**. v.17, n. 10, p.1077-1080, 1995a.

BERGER, J.L.; LEE,B.H.; LACROIX, C. Immobilization of β -galactosidase from *Thermus aquaticus* YT-1 for oligosaccharides synthesis. **Biotechnology Techniques**. v. 9, n. 8, p. 601-601, 1995b.

BERGER, J.L.; LEE,B.H.; LACROIX, C. Purification, properties and characterization of a high-molecular-mass β -galactosidase isoenzyme from *Thermus aquaticus* YT-1. **Biotechnology Applied and Biochemistry**. v.25, p.29-41, 1997.

BOON, M.A.; JANSSEN, A.E.M.; VAN'T RIET, K. Effect of temperature and enzyme origin on the enzymatic synthesis of oligosaccharides. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 26, p.271-281, 2000.

CHONAN, O.; WATANUKI, M. Effect of galactooligosaccharides on calcium absorption in rats. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**. v.41, p.95-104, 1995.

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

CRUZ, R.; CRUZ, V.D.; BELOTE, J.G.; KHENAYFES, M.O. DORTA, C.; OLIVEIRA, L.H.S.; ARDILES, E.; GALLI, A. Production of transgalactosylated oligosaccharides (TOS) by galactosyltransferase activity from *Penicillium simplicissimum*. **Bioresource Technology**. v. 70, p. 165-171, 1999.

DUMORTIER, V.; BRASSART, C. BOUQUELET, S. Purification and properties of a β -D-galactosidase from *Bifidobacterium bifidum* exhibiting a transgalactosylation reaction. **Biotechnology Applied Biochemistry**. v. 19, p. 341-354, 1994.

FERNANDES, S.; GEUEKE, B.; DELGADO, O.; COLEMAN, J.; HATTI-KAUL, R. β -galactosidase from a cold-adapted bacterium: purification, characterization and application for lactose hydrolysis. **Applied Microbiology Biotechnology**. v. 58, n. 3, p. 313-21, 2002.

GORIN, P. A.J.; SPENCER, J.F.T.; PHAFF, H.J. The structures of galactosyl-lactose and galactobiosyl-lactose produced from lactose by *Sporobolomyces singularis*. **Canadian Journal of Chemistry**. v. 42, 1964.

GREENBER, N.A.; MAHONEY, R.R. Formation of oligosaccharides by β -galactosidase from *Streptococcus thermophilus*. **Food Chemistry**. v.10, p.195-204, 1983.

HUBER, R.E.; KURZ, G.; WALLENFELS, K. A quantitation of the factors which affect the hydrolase and transgalactosylase activities of β -galactosidase (*E. coli*) on lactose. **Biochemistry**. v.15, n.9, 1976.

HUNG M. N.; LEE, B. H. Purification and characterization of a recombinant with transgalactosylation activity from *Bifidobacterium infantis* HL96. **Applied Microbiology Biotechnology**. v. 58, n. 4, p. 439-45, 2002.

ISHIKAWA, F.; TAKAYAMA, H.; MATSUMOTO, K.; ITO, M.; CHONAN, O.; DEGUCHI, Y.; KIKUCHI-HAYAKAWA, H.; WATANUKI, M. Effects of β 1-4 linked galacto-oligosaccharides on human fecal microflora. **Bifidus**. v.9, p. 5-18, 1995.

IWASAKI, K.; MISUTOSHI, N.; NAKAO, S. Galacto-oligosaccharide production from lactose by an enzymic batch reaction using β -galactosidase. **Process Biochemistry**. v. 31, n. 1, p. 69-76, 1996.

KIM, J. W.; RAJAGOPAL, S. N. Isolation and characterization of β -galactosidase from *Lactobacillus crispatus*. **Folia Microbiol** (Praha). v. 45, n. 1, p. 29-34, 2000.

MATSUMOTO, K. KOBAYASHI, Y.;UEYAMA, S.; WATANABE, T. TANAKA, R. KAN, T. KUROBA, A.; SUMIHARA, Y. (1990). Galactooligosaccharides. In: NAKANUKI, T (Ed.). Oligosaccharides: production, properties and applications. Shizuoka: Gordon and Breach Science, 1995, p. 90-106 (Japanese Technology Reviews).

MILLER-CATCHPOLE, R. Bifidobacteria in clinical microbiology and medicine. **Biochemistry and Physiology of Bifidobacteria**, eds A. Bezkorovainy & Miller-Catchpole. CRC Press, Boca Raton, FL, USA, 1989.

MITSUOKA, T. Bifidobacteria and their role in human health. **Journal of Industrial Microbiology**. v. 6, p. 263-268, 1990.

MODLER, H.W. Bifidogenic factors – Sources, metabolism and applications. **International Dairy Journal**. v. 4, p. 383-407, 1994.

MODLER, H.W.; McKELLAR, R.C.; YAGUCHI, M. Bifidobacteria and bifidogenic factors. **Canadian Inst. Food Science. Technology. J.** v. 23, n. 1, p. 29-41, 1990.

NAGY, Z.; KISS, T.; SZENTIRMAI, A.; BIRO, S. β -galactosidase of *Penicillium chrysogenum*: production, purification and characterization of the enzyme. **Protein Expr Purif.** v. 21, n. 1, p. 24-9, 2001.

NAKANO, H. **Recente japanese development in the enzymatic production and application of oligosaccharides**; apresentado no Seminar on enzyme and bacterial technology, 1998, Campinas. Japan International Cooperation Agency, [s.d.].

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.

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.

ONISHI, N.; YAMASHIRO, A.; YOKOZEKI, K. Production of galacto-oligosaccharide from lactose by *Sterigmatomyces elviae* CBS8119. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 61, n.11, p.4022-4025, 1995.

ONISHI, N.;TANAKA, T. Purification and properties of a novel thermostable galacto-oligosaccharide producing β -galctosidases from *Sterigmatomyces elviae* CBS8119. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 61, n.11, p.4026-4030, 1995.

ONISHI, N.; TANAKA, T. Purification and characterization of galacto-oligosaccharide-producing β -galactosidase from *Sirobasidium magnum*. **Letters in Applied Microbiology**. v. 24, p. 82-86, 1997.

PARK, Y.K.; de SANTI, M.S.S.; PASTORE, G.M. Production and characterization of β -galactosidase from *Aspergillus oryzae*. **Journal of Food Science**. v.44, n.1, p.100-103, 1979.

PERRIN, V.; FENET, B.; PRALY, J.; LECROIX, F.; DUNG TA, C. Identification and synthesis of a trisaccharides produced from lactose by transgalactosylation. **Carbohydrate Research**. v. 325, p. 202-210, 2000.

PRAKASH, S.; SUYAMA, K; ITOH. T. ADACHI. S. Oligosaccharide formation by *Trichoderma harzianum* in lactose containig medium. **Biotechnology Letters**. v. 9, n.4, p.249-252, 1987.

PRAKASH, S.; SUYAMA, K; ITOH. T. ADACHI. S. Structure elucidation of major galacto oligosaccharides formed by growing culture of *Trichoderma harzianum*. **Journal Agriculture Food Chemistry**. v. 37, p.334-337, 1989.

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

RASIC, J.L.; KURMANN, J. A. Bifidobacteria and their role. Birkhäuser Verlag, Boston, MA, USA, 1983. In: MODLER, H. W. Bifidogenic factors – Sources, metabolism and applications. **International Dairy Journal**. v. 4, p. 383-407, 1994.

RICHMOND, M.L.; STINE, C.M. β -galactosidase: review of recent research related to technological applications, nutritional concerns, and immobilization. **Journal of Dairy Science**. v. 64, n. 9, p. 1579-1771, 1981.

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.

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.

SHAIKH, S. A.; KHIRE, J. M.; KHAN, M.I. Characterization of a thermostable extracellular β -galactosidase from a thermophilic fungus *Rhizomucor* sp. **Biochimical Biophysica Acta**. v. 1472 n.1-2, p. 314-22, 1999.

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.

SHIN, H.; YANG, J. Galacto-oligosaccharide production by β -galactosidase in hydrophobic organic media. **Biotchnology Letters**. V. 16, n.11, p.1157-1162, 1994.

TAKANO, K.; MIWA, T. J. Biochem. v. 40, p.471, 1953. In WALLENFELS, K.; MALHOTRA, O. P. Galactosidase. **Advances Carbohydrate Chemistry**. v. 16, p. 239-298, 1961.

TAMAI, S.; OHTSUKA, K.; OZAWA, O. UCHIDA, T. Effects of a small amounts of galactooligosaccharides on fecal *Bifidobacterium*. **Journal of the Japanese Society of Nutrition and Food Science**. v.45, p. 456-460, 1992.

TEURI, U.; KORPELA, R.; SAXELIN, M.; MONTONEN, L.; SALMINEN, S. Increased fecal frequency and gastrointestinal symptoms following ingestion of galacto-oligosaccharide-containing yogurt. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**. v.44, p. 465-471, 1998.

TOBA, T.; ADACHI, S. Hydrolysis of lactose by microbial β -galactosidase. Formation of oligosaccharides with special reference to 2-O- β -D- galactopyranosyl-D-glucose. **Journal of Dairy Science**. v. 61, n.1, 1978.

TOBA, T.; YOKOTA, A.; ADACHI, S. Oligosaccharide structures formed during the hidrolysis of lactose by *Aspergillus oryzae* β -galactosidase. **Food Chemistry**. v. 16, p. 147-162, 1985.

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

VAN LAERE, K. M.; ABEE, T.; SCHOLS H.A.; BELDMAN, G.; VORAGEN A. G. Characterization of a novel β -galactosidase from *Bidobacterium adolescentis* DSM 20083 active towards transgalactooligosaccharides. **Applied Environmental Microbiology**. v. 66, n. 4, p. 1379-84, 2000.

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

WALLENFELS, K.; MALHOTRA, O. P. Galactosidase. **Advances Carbohydrate Chemistry**. v. 16, p. 239-298, 1961.

WHITAKER, J.R. **Principles of Enzymology for the Food Sciences**. New York: Marcel Dekker, 1994, 624p.

CAPÍTULO 2

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DA β -GALACTOSIDASE DE *Scopulariopsis* sp COM ATIVIDADE DE TRANSGALACTOSILAÇÃO

RESUMO

Uma cepa de *Scopulariopsis* sp, produtora de β -galactosidase extracelular, foi isolada do solo. Esta enzima é usada industrialmente para a hidrólise de lactose de leite e de soro de leite com diversas aplicações. Em altas concentrações de lactose a β -galactosidase tem atividade de galactosiltransferase, produzindo uma mistura de galactooligossacarídeos. O *Scopulariopsis* foi produzido por fermentação semi-sólida e submersa, com e sem lactose. A enzima obtida foi fracionada com etanol, acetona e sulfato de amônio. A atividade de transgalactosilação da β -galactosidase foi avaliada por cromatografia de papel. O microrganismo acumulou grande quantidade de β -galactosidase, que foi produzida constitutivamente. A precipitação da enzima com sulfato de amônio apresentou melhores resultados que a com etanol e acetona. A β -galactosidase do extrato enzimático foi caracterizada bioquimicamente, apresentando um pH ótimo de 4,5 e temperatura ótima de 65°C, e estabilidade enzimática em pH 5,0 e 50°C. Quando incubada com alta concentração de lactose a enzima apresentou atividade de transgalactosilação.

SUMMARY

A strain of *Scopulariopsis* sp which produced high activity of extracellular β -galactosidase was isolated from soil. This enzyme is used industrially for the hydrolysis of lactose from milk and milk whey for several applications. In high lactose concentrations the β -galactosidase has galactosyltransferase activity, producing a galactooligosaccharides mixture. *Scopulariopsis* was grown by semi-solid fermentation and submerge culture with and without lactose. The enzyme obtained was fractionated with ethanol, acetone and ammonium sulphate. Transgalactosylation activity of the β -galactosidase was evaluated by paper

chromatography. The strain of *Scopulariopsis* accumulated large amounts of the β -galactosidase on wheat bran medium and the enzyme was produced constitutively. Precipitation with ammonium sulphate showed better results than with ethanol and acetone. The enzymatic extract was biochemically characterized, showing an optimum pH of 4.5 and optimum temperature of 65°C, and the enzymatic stability was at pH 5.0 and 50°C. When incubated with high lactose concentrations the enzyme showed transgalactosylation activity.

1. INTRODUÇÃO

O fungo *Scopulariopsis sp* (figura 2.1) foi encontrado como o maior produtor de β -galactosidase entre os 1067 microrganismos estudados (PASTORE e PARK, 1979). Industrialmente a β -galactosidase é utilizada para romper as ligações glicosídicas da lactose, formando uma solução de glicose e galactose com leve aumento do sabor doce, mas também se tem atribuído grande importância para a atividade de síntese de oligossacarídeos (CRUZ et al., 1999). A β -galactosidase é uma das enzimas mais estudadas e relatadas na literatura, ocorre em vegetais, em órgãos de animais e também é produzida por uma grande quantidade de microrganismos, sendo esta a fonte mais aceitável para produção e aplicação industrial (RICHMOND e STINE, 1981).

Na presença de baixas concentrações de lactose a enzima apresenta ação catalítica e em altas concentrações do substrato ocorre reação de transferência e síntese (atividade de transgalactosilação) com a formação de galactooligossacarídeos. Estes são considerados como prebióticos e sua ingestão na dieta resulta em um aumento na ocorrência e no número de bifidobactérias no trato intestinal (MODLER, 1994), promovendo efeitos benéficos para a saúde. (TOMOMATSU, 1994).

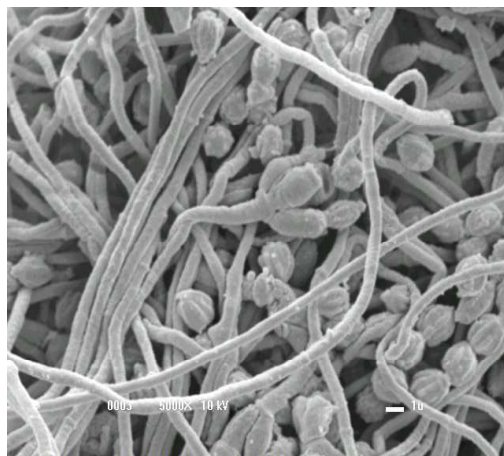


Figura 2.1 – Fotografia de *Scopulariopsis* sp por microscopia eletrônica de varredura, material fixado com glutaraldeído e OsO₄, com aumento de 5000x

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MICRORGANISMO PRODUTOR DE β -GALACTOSIDASE

O microrganismo utilizado neste trabalho foi o fungo *Scopulariopsis* sp isolado por PASTORE e PARK (1979), depositado na American Type Culture Collection (ATCC) sob o número 44206. O fungo foi produzido por fermentação semi-sólida (item 2.2) e submersa. Neste último caso o meio de cultivo foi composto de 1,5% de peptona, 1% de extrato de levedura, 1% de fosfato diácido de sódio, 0,2% de nitrato de sódio e como fonte de carbono foi adicionado 1% de glicose ou 1% de lactose, pH 5,5; sendo cultivado a 30°C por 10 dias. O peso seco do micélio foi determinado por gravimetria.

2.2 PREPARO DO EXTRATO ENZIMÁTICO

O fungo foi cultivado em farelo de trigo e água ou solução de lactose 1% na proporção de 1:1 (p/v). Em frascos Erlenmeyers de 500 mL, contendo 20 g de substrato e esterilizados à 121°C por 20 minutos, foi adicionada uma suspensão de esporos (10^8 esporos/mL). Os frascos foram incubados a 30°C por 15 dias. Após o crescimento foi adicionada água destilada e o meio triturado com bastão de vidro para liberação da enzima, obtendo-se após filtração o extrato enzimático .

2.3 Fracionamento de proteínas

No extrato enzimático obtido do cultivo do microrganismo em farelo de trigo e água foi testado diferentes condições de fracionamento de proteínas. Foi utilizado sulfato de amônio a 40, 60 e 80% de saturação, etanol com concentração final de 50 e 70%, deixando-se agir por uma noite, e acetona com concentração final de 50%, por 40, 90 e 180 minutos. O precipitado obtido com sulfato de amônio foi dialisado contra água, centrifugado e liofilizado, os obtidos com etanol e acetona foram espalhados em placas de vidro, raspados e recolhidos em forma de pó. Os precipitados (enzima bruta) foram armazenados à -18°C.

2.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE β -GALACTOSIDASE

A atividade da β -galactosidase (EC 3.2.1.23 β -galactosídeo galactohidrolase) foi determinada usando os substratos lactose e *o*-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo-ONPG (WALLENFELS e MALHOTRA, 1961).

2.4.1 Determinação da atividade de β -galactosidase com *o*-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo (ONPG)

O meio de reação constou de 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 em absorbância a 420 nm, contra branco. 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.

2.4.2 Determinação da atividade de β -galactosidase com lactose

A mistura reativa foi formada com 4 mL de solução a 1% de lactose em tampão acetato de sódio 0,1 M pH 5,0 e 1 mL de solução enzimática na concentração adequada. A mistura foi incubada a 55°C por 15 minutos. Após a incubação, a quantidade de glicose liberada através da hidrólise da lactose foi

determinada pelo sistema enzimático glicose-oxidase-peroxidase e reativo cromogênico (DAHLQUIVIST, 1961). Uma unidade de enzima é a quantidade necessária para liberar 1 μ mol de glicose por minuto, nas condições de ensaio.

2.5 Caracterização bioquímica parcial de β -galactosidase

Para a caracterização a enzima bruta foi ressuspensa em água e centrifugada, sendo utilizado o sobrenadante.

2.5.1 Efeito do pH e temperatura na atividade enzimática

Para o efeito do pH a atividade enzimática foi determinada em tampão acetato de sódio para valores de pH entre 3,5 e 5,5; fosfato para valores de pH entre 6,0 e 8,0 e borato para pH 9,0.

Para o efeito da temperatura a atividade enzimática foi avaliada entre 35°C e 80°C, com variações de 5°C.

Foram utilizados os substratos ONPG e lactose, e a determinação da atividade foi realizada como descrito no item 2.4.

2.5.2 Efeito do pH e temperatura na estabilidade enzimática

Para determinação do pH de estabilidade, a enzima foi incubada por 1, 3, 18 e 24 horas em valores de pH entre 3,5 e 7,0 à 40°C, sendo a atividade enzimática residual medida à 60°C em pH 5,0 por 15 minutos, utilizando ONPG como substrato.

Para a determinação da temperatura de estabilidade, a enzima foi incubada por 3, 18, 24 e 48 horas em pH 5,0 e temperaturas de 50, 60 e 70°C, sendo a atividade enzimática determinada conforme item 2.4.1.

2.6 PRODUÇÃO DE GALACTOOLIGOSSACARÍDEOS

A produção de galactooligossacarídeos foi realizada a partir de soluções com 5, 10, 15, 20, 25, 30 e 35% de lactose (p/v) em tampão acetato de sódio 0,1M pH 5,0; com 6 mg/mL de enzima bruta precipitada com sulfato de amônio 80%, à 60°C por 2 horas. Também foi testada a atuação da enzima em 4, 8, 12, 24, 30,

36, 48 e 52 horas com 35% de lactose (p/v). A reação foi paralisada com a inativação da enzima em banho fervente por 10 minutos e as amostras foram analisadas qualitativamente por cromatografia em papel.

2.7 CROMATOGRAFIA EM PAPEL

A cromatografia foi realizada em papel Whatman n.º1, sendo aplicados 1µL 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 solventes acetato de etila, álcool isopropílico e água na proporção 6:3:1 (v/v). O cromatograma foi revelado com reagente difenilamina-anilina-ácido fosfórico, seguido de aquecimento em estufa a 100°C (LUND e WYATT, 1973).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Produção de β -galactosidase

O microrganismo *Scopulariopsis* sp cresceu bem no substrato semi-sólido e sintetizou a enzima β -galactosidase, a qual apresentou atividade após o quinto dia de fermentação atingindo o seu máximo após o décimo segundo dia de crescimento (figura 2.2). O fungo sintetizou a enzima sem a necessidade do indutor lactose, demonstrando ser uma enzima constitutiva. A maioria dos microrganismos relatados na literatura necessita de lactose para a produção de β -galactosidase (NAKAO et al., 1994; ONISHI e TANAKA, 1997). Quando produzido por fermentação submersa, atingiu seu crescimento máximo em 72 horas de cultivo (figura 2.3), porém não sintetizou a β -galactosidase.

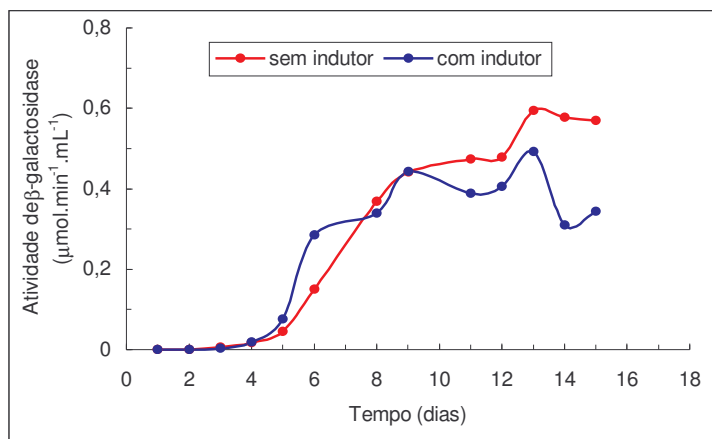


Figura 2.2 – Produção de β -galactosidase por fermentação semi-sólida em meio farelo de trigo à 30°C por 15 dias

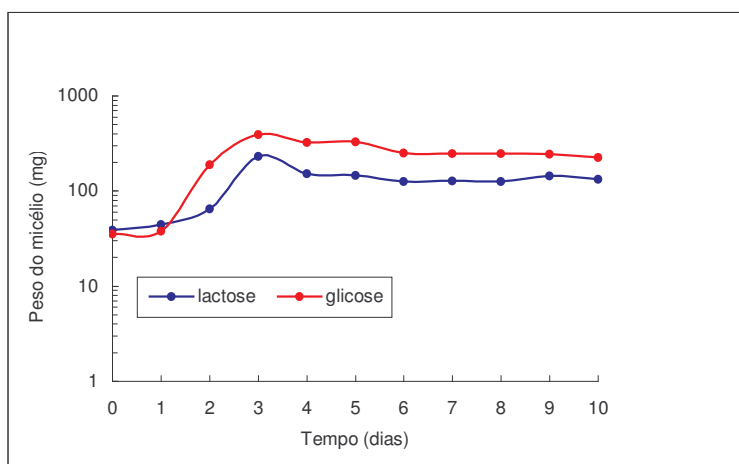


Figura 2.3 – Curva de crescimento de *Scopulariopsis* sp por fermentação submersa em meios contendo glicose ou lactose como fonte de carbono, em pH 5,5 à 30°C por 10 dias

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 uma fonte acessível e de baixo custo.

3.2 FRACIONAMENTO DE PROTEÍNAS

A Tabela 2.1 ilustra a obtenção de β -galactosidase do extrato enzimático utilizando-se fracionamento com sulfato de amônio e solvente orgânico. No tratamento com o solvente orgânico acetona houve uma perda de atividade enzimática em torno de 30% em todos os tempos estudados. Quando foi utilizado etanol a atividade da enzima foi praticamente reduzida a metade. Assim, os extratos enzimáticos fracionados com os solventes orgânicos levaram a diminuição da atividade enzimática, provavelmente devido a desnaturação proteica. A precipitação com sulfato de amônio não foi eficiente com 40 e 60% de saturação, sendo o melhor tratamento a 80%, quando ocorre a concentração da enzima em torno de 3 vezes. Como primeira etapa de purificação da β -galactosidase o método de escolha, por diversos autores, tem sido precipitação com sulfato de amônio, demonstrando este ser o procedimento mais eficiente (HUBER et al., 1976; NAKAO et al., 1994; BERGER et al, 1997; SHAIKH et al., 1999; NAGY et al., 2001).

Tabela 2.1 – Atividade de β -galactosidase após precipitação com diferentes agentes

	Atividade $\mu\text{mol}.\text{min}^{-1}.\text{mL}^{-1}$
Enzima bruta	1,44
Etanol 50%	0,63
70%	0,76
Sulfato de amônio 40%	0,07
60%	0,28
80%	4,68
Acetona 50% - 40min	0,99
90min	0,89
180min	1,03

3.3 Caracterização bioquímica parcial de β -galactosidase

3.3.1 Efeito do pH e temperatura na atividade enzimática

O efeito do pH na atividade enzimática está apresentado na figura 2.4. Foi observado que com ambos os substratos, ONPG e lactose, a atividade enzimática teve seu ótimo em torno do valor de pH 4,5, demonstrando que a β -galactosidase de *Scopulariopsis* sp foi mais ativa em condições ácidas.

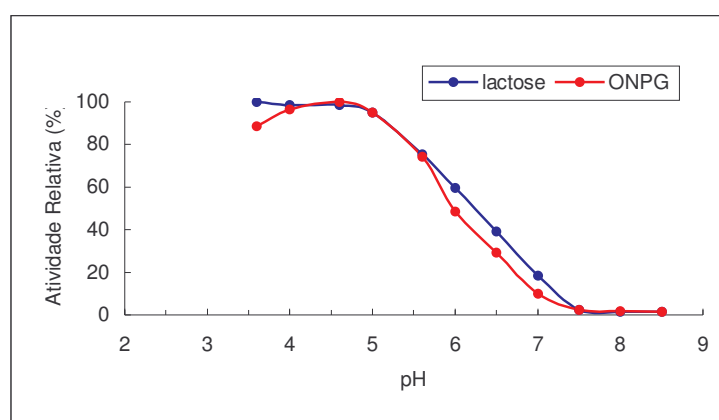


Figura 2.4 – Efeito do pH na atividade de β -galactosidase de *Scopulariopsis* sp sobre os substratos ONPG e lactose à 60°C

O valor aproximado de pH 4,5 para melhor atuação da β -galactosidase de *Scopulariopsis* sp está de acordo com o obtido por PASTORE e PARK (1980) para esta enzima. O mesmo valor foi encontrado, tendo como substrato o ONPG, para β -galactosidase de *Sterigmatomyces elviae* CBS8119 (ONISHI e TANAKA, 1995), para β -galactosidase de *Sirobasidium magnum* (ONISHI e TANAKA, 1997) e para β -galactosidase de *Rhizomucor* sp (SHAIKH et al., 1999). A primeira β -galactosidase obtida em sua forma pura e cristalina foi de *Escherichia coli* e seu pH ótimo de atuação para ONPG foi em torno de pH 7,5 (WALLENFELS e MALHOTRA, 1961). Outros valores foram obtidos para β -galactosidas de outras fontes, como pH 5,5 para β -galactosidas de *Thermus aquaticus* YT-1 (BERGER et al., 1997); pH 6,0 para β -galactosidase de *Bifidobacterium adolescentis* e abaixo

de pH 5,0 a enzima não apresentou atividade (VAN LAERE et al., 2000); pH 4,0 para β -galactosidase de *Penicillium chrysogenum* (NAGY et al., 2001); para β -galactosidase de *Bacillus coagulans* o pico de atividade foi entre os valores de pH 6,0 e 7,0 (BATRA et al., 2002); pH 7,5 para β -galactosidase de *Bifidobacterium infantis* HL96 (HUNG e LEE, 2002).

Nas condições testadas, a β -galactosidase de *Scopulariopsis sp* apresentou atividade ótima à 65°C para ambos os substratos (figura 2.5), porém à 60 e 70°C a enzima apresentou 97 e 94% de sua atividade, respectivamente para o substrato lactose e 91 e 90%, para ONPG. PASTORE e PARK (1980) relataram que a dessa linhagem apresentou atividade ótima à 60°C em substrato ONPG.

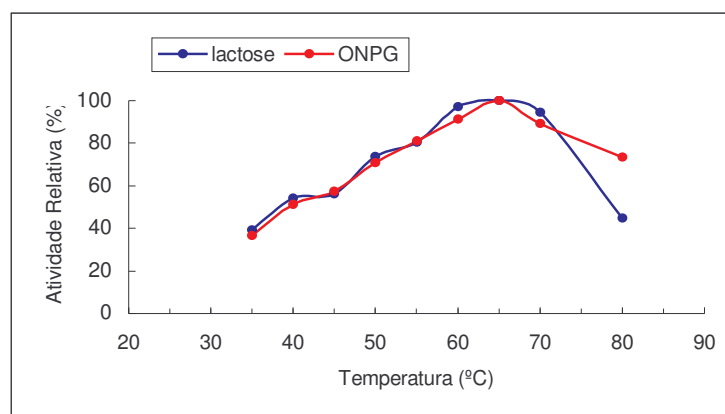


Figura 2.5 – Efeito da temperatura na atividade de β -galactosidase de *Scopulariopsis sp* sobre o substrato ONPG pH 5,0 e sobre o substrato lactose em pH 5,5

A temperatura de 60°C também foi considerada ótima para β -galactosidase de *Rhizopus sp* (SHAIKH et al., 1999) e de *Bifidobacterium infantis* (HUNG e LEE, 2002); 65°C para β -galactosidase de *Sirobasidium magnum* (ONISHI e TANAKA, 1997) e de *Bacillus coagulans* (BATRA et al., 2002); para β -galactosidase de *Thermus aquaticus* YT-1 foi encontrada a temperatura ótima de

80°C (BERGER et al., 1997) e 85°C para β -galactosidase de *Sterigmatomyces elviae* CBS8119 (ONISHI e TANAKA, 1995).

O valor alto encontrado para temperatura ótima de atividade da β -galactosidase de *Scopulariopsis* sp associado ao pH ácido é de grande interesse para aplicação industrial, pois estas condições minimizam contaminações microbianas.

3.3.2 Efeito do pH e temperatura na estabilidade enzimática

O efeito do pH na estabilidade da enzima está apresentado na figura 2.6. A β -galactosidase de *Scopulariopsis* sp apresentou maior estabilidade em pH 5,0 mantendo 100% de sua atividade por 24 horas à 40°C. Neste mesmo período ocorreu a perda de 50% de atividade em pH 4,5 e pH 5,5 e nos demais valores de pH testados a enzima apresentou ao redor de 95% de inativação.

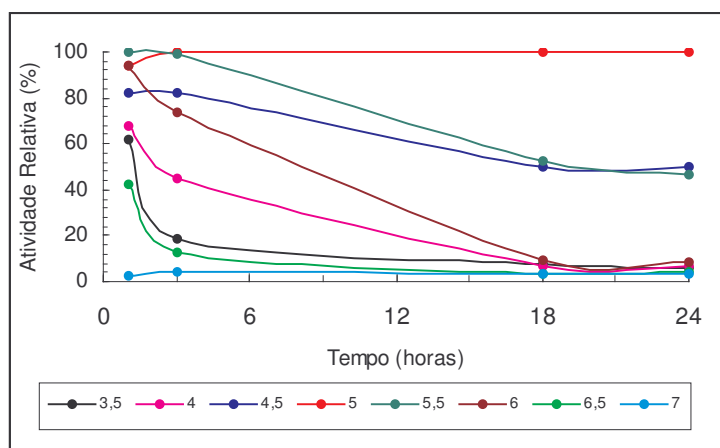


Figura 2.6 – Efeito do pH na estabilidade da β -galactosidase de *Scopulariopsis* sp após 24 horas de incubação à 40°C.

Em outro estudo esta mesma enzima apresentou uma maior faixa de estabilidade com valores de pH entre 3,8 a 8,5 após 24 horas a temperatura ambiente (PASTORE, 1982). Nos valores de pH entre 2,5 e 7,0 a β -galactosidase de *Sterigmatomyces elviae* manteve-se estável (ONISHI e TANAKA, 1995). A β -galactosidase de *Thermus aquaticus* YT-1 apresentou estabilidade entre os

valores de pH 3,0 e 12,0 por 5 horas à 30°C (BERGER et al., 1997); para β -galactosidase de *Sirobasidium magnum* foi obtida uma estabilidade entre os valores de pH 4,0 e 7,0 por 1 hora à 40°C (ONISHI e TANAKA, 1997); para β -galactosidase de *Bacillus coagulans* foram encontrados os valores de pH entre 5,0 e 8,0 (BATRA et al., 2002).

Mesmo sendo encontrado ampla faixa de estabilidade ao pH para algumas β -galactosidasas, se tem observado na literatura consultada períodos de exposição da enzima menores que 24 horas em temperaturas inferiores a 40°C. Demonstrando que a β -galactosidase de *Scopulariopsis* sp é bastante estável por longo período.

A β -galactosidase de *Scopulariopsis* sp mostrou-se estável após 3 horas de incubação à 50°C em pH 5,0, sendo que reteve 88, 87 e 72% da atividade inicial após 18, 24 e 48 horas de tratamento térmico nessa temperatura

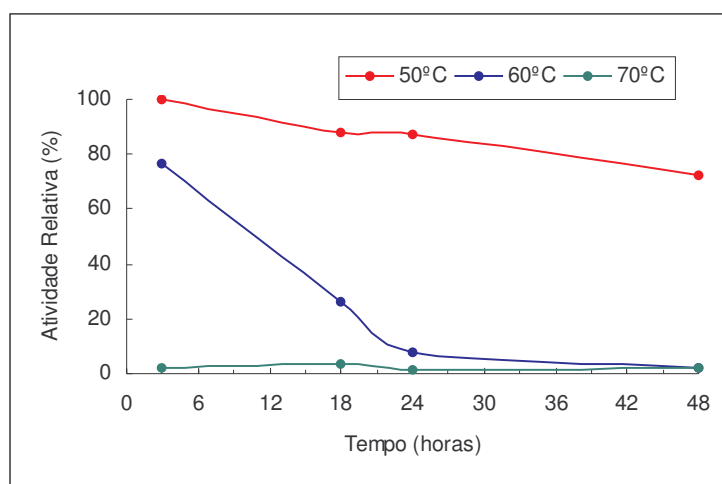


Figura 2.7 – Efeito da temperatura na estabilidade da β -galactosidase de *Scopulariopsis* sp após 48 horas de incubação em pH 5,0

PASTORE (1982) relatou que a β -galactosidase dessa linhagem de *Scopulariopsis* sp manteve 80% da atividade inicial quando incubada a 60°C por 35 horas em pH 5,0, com uma rápida inativação à 65°C. A β -galactosidase de

Rhizomucor sp foi estável a 60°C por 4 horas (SHAIKH et al., 1999); para β -galactosidase de *Sirobasidium magnum* mostrou estabilidade após 1 hora de incubação à 65°C (ONISHI e TANAKA, 1997); a β -galactosidase de *Steribmatomyces elviae* CBS8119 reteve 90 e 62% de sua atividade à 80 e 85°C, respectivamente por 1 hora (ONISHI e TANAKA, 1995). A β -galactosidase de *Bacillus coagulans* apresentou 50% de inativação quando mantida a 65°C por 2 horas e quando exposta a 63°C manteve sua atividade por 15 horas (BATRA et al., 2002).

3.4 Produção de galactooligossacarídeos

Os cromatogramas obtidos por cromatografia de papel estão apresentados nas figuras 2.8 e 2.9.

A capacidade da β -galactosidase de *Scopulariopsis* sp em realizar a reação de transferência e síntese foi testada, conforme descrito em material e métodos no item 2.6. O volume de aplicação das amostras foi padronizado para que se pudesse ter uma idéia de concentrações, apesar de não ter sido feita a quantificação das manchas.

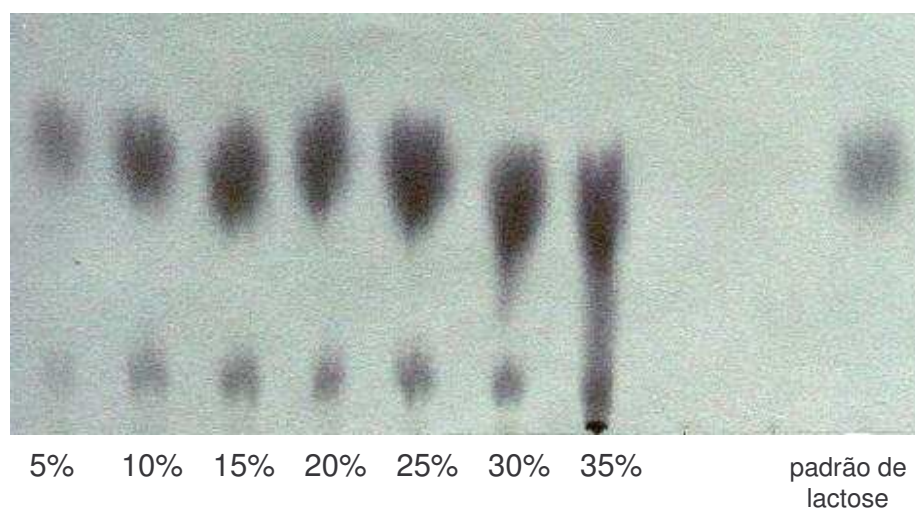


Figura 2.8 – Efeito da concentração de lactose em % (p/v) na produção de galactooligossacarídeos, utilizando-se β -galactosidase de *Scopulariopsis* sp. Cromatografia de carboidratos em papel, tendo como fase móvel acetato de etila, álcool isopropílico (6:3:1) e revelador difenilamina-anilina-ácido fosfórico

Na figura 2.8 as manchas superiores foram identificadas como lactose, pois apresentaram o mesmo Rf do padrão e as manchas indicadas por seta, como compostos de maior peso molecular. Pela intensidade de coloração foi observado que a medida que se aumentava a concentração de lactose as manchas intensificavam sua cor, indicando que quanto mais lactose houver no sistema maior será a produção de galactooligossacarídeos (LÓPEZ-LEIVA e GUSMAN, 1995; ALBAYRAK e YANG, 2002; ROY et al., 2002).

A enzima sintetizou carboidratos maiores que o dissacarídeo lactose, pois na separação dos açúcares os monossacarídeos são os que mais migram (não mostrados) e as estruturas maiores ficam mais próximas do ponto de aplicação. Como o sistema só era composto por lactose e enzima em tampão, sugere-se que as estruturas maiores encontradas (indicadas por seta) sejam galactooligossacarídeos, os quais são formados por lactose e unidades de galactose (ZARATÉ e LÓPEZ-LEIVA, 1990).

Conforme visualizado na figura 2.9, as manchas mais fortes e superiores foram identificadas como lactose, por apresentarem o mesmo Rf do padrão. Abaixo da lactose observa-se a separação de 3 compostos (indicados por setas) de maiores pesos moleculares que o dissacarídeo, podendo-se sugerir se tratar de trissacarídeos, tetrassacarídeos e pentassacarídeos.

Em 24 horas de reação (figura 2.9 - amostra 4) as manchas começaram a aparecer com coloração mais intensa, indicando que ocorreu maior produção de galactooligossacarídeos a partir deste tempo. Mais tarde sendo analisados outros sistemas de reação por cromatografia líquida de alta eficiência, foi encontrado um pico logo após o de lactose identificado como 4'galactosil-lactose e ainda outros picos de compostos de maiores pesos moleculares que este trissacarídeo, este perfil pode ser exemplificado pelo cromatograma apresentado na figura 5.4 (capítulo 5). O trissacarídeo 4'galactosil-lactose, formado por duas moléculas de galactose e uma de glicose é de grande interesse por apresentar comprovada função bifidogênica (OHTSUOKA et al., 1989).

As manchas reveladas com o reagente difenilamina-anilina-ácido fosfórico apresentaram-se com coloração azulada. Segundo SCHWIMMER e BEVENUE

(1956), estudando a degradação do amido por cromatografia de papel, a utilização deste revelador apresenta coloração azul à púrpura quando as ligações dos carboidratos são do tipo β -1,4 e para ligações β -1,6 a coloração é verde à amarelo (SCHWIMMER e BEVENUE, 1956). Assim, pode-se sugerir que os galactooligossacarídeos estudados são formados por ligações β -1,4.

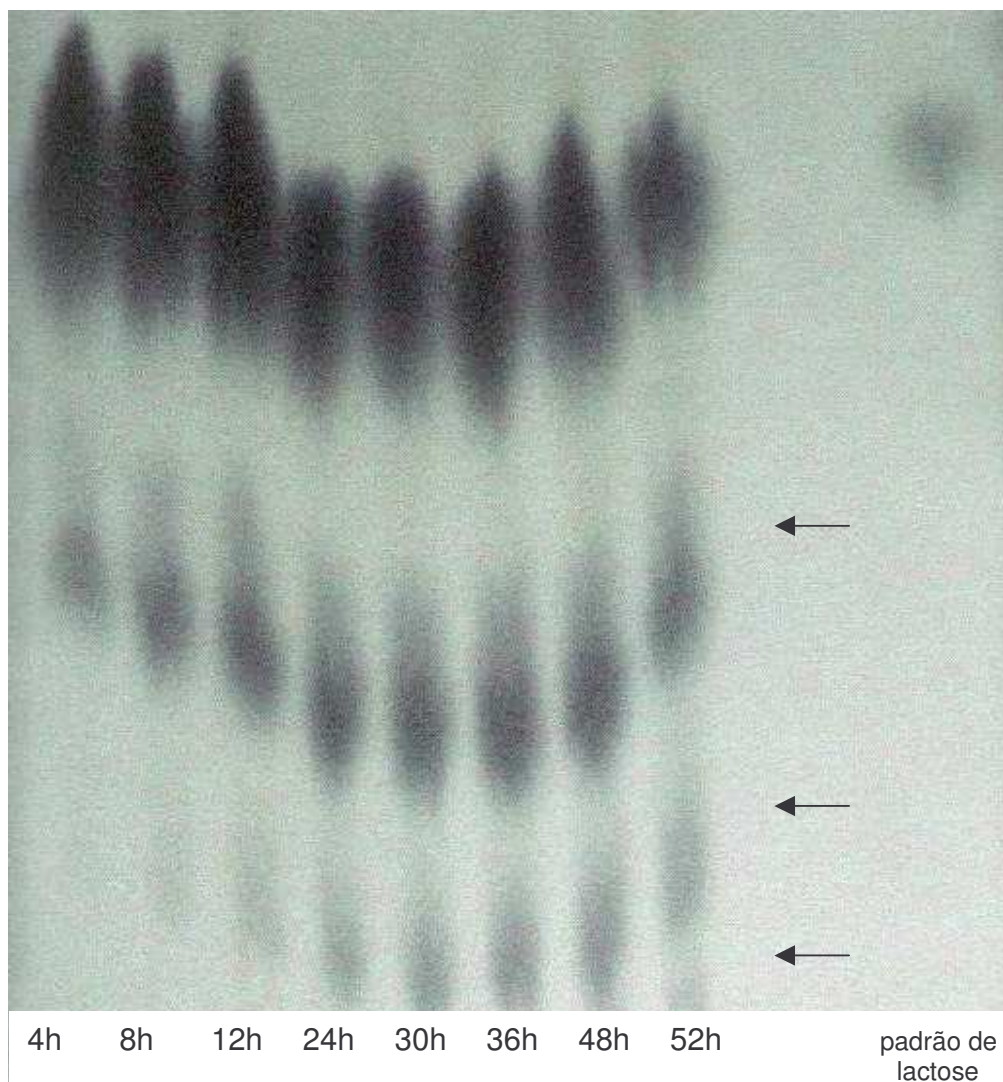


Figura 2.9 – Efeito do tempo de reação na produção de galactooligossacarídeos a partir de solução de lactose a 35% (p/v) utilizando-se β -galactosidase de *Scopulariopsis* sp. Cromatografia de carboidratos em papel, tendo como fase móvel acetato de etila, álcool isopropílico (6:3:1) e revelador difenilamina-anilina-ácido fosfórico.

4. CONCLUSÕES

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

A enzima β -galactosidase foi sintetizada sem necessidade de indutor, demonstrando ser constitutiva.

O extrato enzimático manteve maior atividade quando o fracionamento das proteínas foi feito com sulfato de amônio a 80% de saturação.

A β -galactosidase apresentou atividade ótima, para os substratos lactose e ONPG, em pH 4,5 e à 65°C. A enzima mostrou maior estabilidade em pH 5,0, mantendo 100% de atividade após 24 horas de incubação a 40°C. A β -galactosidase mostrou-se estável após 3 horas de incubação a 50°C sendo que reteve 88, 87 e 72% da atividade inicial após 18, 24 e 48 horas, respectivamente.

A enzima apresentou atividade de transgalactosilação sintetizando açúcares maiores que o substrato lactose, sendo estes considerados galactooligossacarídeos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.

BATRA, N.; SINGH, J.; BANERJEE, U. C.; PATNAIK, P. R.; SOBTI, R. C. Production and characterization of a thermostable β -galactosidase from *Bacillus coagulans* RCS3. **Biotechnology Applied Biochemistry**. v. 36, part1, p. 1-6, 2002.

BERGER, J.L.; LEE,B.H.; LACROIX, C. Purification, properties and characterization of a high-molecular-mass β -galactosidase isoenzyme from *Thermus aquaticus* YT-1. **Biotechnology Applied and Biochemistry**. v.25, p.29-41, 1997.

CRUZ, R.; CRUZ, V.D.; BELOTE, J.G.; KHENAYFES, M.O.; DORTA, C.; OLIVEIRA, L.H.S.; ARDILES, E.; GALLI, A. Production of transgalactosylated oligosaccharides (TOS) by galactosyltransferase activity from *Penicillium simplicissimum*. **Bioresource Technology**. v. 70, p. 165-171, 1999.

DAHLQVIST, A. Determination of maltase and isomaltase activities with a glucose-oxidase reagent. **Biochemistry Journal**. v. 80, p.547-551, 1961.

HUBER, R.E.; KURZ, G.; WALLENFELS, K. A quantitation of the factors which affect the hydrolase and transgalactosylase activities of β -galactosidase (*E. coli*) on lactose. **Biochemistry**. v.15, n.9, 1976.

HUNG M. N.; LEE, B. H. Purification and characterization of a recombinant with transgalactosylation activity from *Bifidobacterium infantis* HL96. **Applied Microbiology Biotechnology**. v. 58, n. 4, p. 439-45, 2002.

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.

LUND, B.M.; WYATT, G.M. The nature of reducing compounds formed from sucrose by *Erwinia carotovora* var. atroseptica. **Journal of General Microbiology**, v.78, p.331-336, 1973.

MODLER, H.W. Bifidogenic factors – Sources, metabolism and applications. **International Dairy Journal**. v. 4, p. 383-407, 1994.

NAGY, Z.; KISS, T.; SZENTIRMAI, A.; BIRO, S. β -galactosidase of *Penicillium chrysogenum*: production, purification and characterization of the enzyme. **Protein Expr Purif**. v. 21, n. 1, p. 24-9, 2001.

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.

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

ONISHI, N.;TANAKA, T. Purification and properties of a novel thermostable galacto-oligosaccharide producing β -galctosidases from *Sterigmatomyces elviae* CBS8119. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 61, n.11, p.4026-4030, 1995.

ONISHI, N.; TANAKA, T. Purification and characterization of galacto-oligosaccharide-producing β -galactosidase from *Sirobasidium magnum*. **Letters in Applied Microbiology**. v. 24, p. 82-86, 1997.

PASTORE, G. M. **Produção, purificação, estudos das propriedades e aplicação da β -galactosidase de *Scopulariopsis* sp.** Campinas, 1982. 87p. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola, Universidade Estadual de Campinas.

PASTORE, G. M.; PARK, Y.K. Screening of high β -galactosidase-producing fungi and characterizing the hydrolysis properties of a selected strain. **Journal of Food Science**. v. 44, p. 1577-1579, 1979.

PASTORE, G.M.; PARK, Y.K. Purification and characterization of β -galactosidase from *Scopulariopsis* sp. **Journal of Fermentation Technology**. v.58, n.1, p.79-81, 1980.

RICHMOND, M.L.; STINE, C.M. β -galactosidase: review of recent research related to technological applications, nutritional concerns, and immobilization. **Journal of Dairy Science**. v. 64, n. 9, p. 1579-1771, 1981.

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.

SCHWIMMER, S.; BEVENUE, A. Reagen for differentiation of 1,4- and 1,6- linked glucosaccharides. **Science**. v. 123, p. 543-544, 1956.

SHAIKH, S. A.; KHIRE, J. M.; KHAN, M.I. Characterization of a thermostable extracellular β -galactosidase from a thermophilic fungus *Rhizomucor* sp. **Biochimical Biophysica Acta**. v. 1472, n.1-2, p. 314-22, 1999.

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

VAN LAERE, K. M.; ABEE, T.; SCHOLS H.A.; BELDMAN, G.; VORAGEN A. G. Characterization of a novel β -galactosidase from *Bidobacterium adolescentis* DSM 20083 active towards transgalactooligosaccharides. **Applied Environmental Microbiology**. v. 66, n. 4, p. 1379-84, 2000.

WALLENFELS, K.; MALHOTRA, O. P. Galactosidase. **Advances Carbohydrate Chemistry**. v. 16, p. 239-298, 1961.

CAPÍTULO 3

PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA β -GALACTOSIDASE DE *Scopulariopsis* sp

RESUMO

A β -galactosidase extracelular de *Scopulariopsis* sp foi semi-purificada por precipitação com sulfato de amônio, cromatografia de troca iônica com resina Sepharose SP e filtração em gel com Sephacryl S-200. Estes procedimentos resultaram em uma purificação de cerca de 13 vezes e um rendimento de aproximadamente 14%. O peso molecular da enzima foi estimado por filtração em gel em torno de 98 KDa. Algumas características da enzima semi-purificada foram determinadas usando *o*-nitrofenil- β -galactopiranosídeo (ONPG) como substrato. O pH e temperatura ótimos de atividade foram em torno de 4,5 e 60°C, respectivamente. A enzima se apresentou estável à 40°C por 24 horas e pH 5,0. Os valores de K_m e V_{max} para ONPG foram 2,28mM e 123 μ moles/mL/min, respectivamente. Os cátions Fe^{+2} , Fe^{+3} e Mn^{+2} ativaram a enzima e N-bromosuccinimida inibiram sua atividade.

SUMMARY

Extracellular β -galactosidase from *Scopulariopsis* sp was semi-purified including precipitation with ammonium sulfate, ion-exchange chromatography on Sepharose SP and gel filtration on Sephacryl S-200. These steps resulted a semi-purification of 13-fold and a yield of about 14%. The molecular weight of the enzyme was estimated to be about 98 KDa by gel filtration. Some enzyme characteristics were determined using *o*-nitrophenyl- β -galactopyranoside (ONPG) as substrate. The pH and temperature optimum of the activity were about 4.5 and 60°C, respectively. The enzyme was stable at 40°C for 24 hours and pH 5.0. The K_m and V_{max} values for ONPG were 2,28mM and 123 μ moles/mL/min, respectively. The cations Fe^{+2} , Fe^{+3} and Mn^{+2} activated the enzyme and N-bromosuccinimide inhibited activity.

1. INTRODUÇÃO

A β -galactosidase (EC 3.2.1.23 β -galactosídeo galactohidrolase), frequentemente denominada de lactase, está presente em vegetais, órgão de animais e também é sintetizada por uma grande quantidade de microrganismos, sendo esta a fonte mais aceitável para produção e aplicação industrial. Esta enzima é clinicamente importante na preparação de leite e derivados livres de lactose para pessoas com intolerância a ela (RICHMOND e STINE, 1981). A lactose hidrolisada também é utilizada para aumentar as suas propriedades edulcorantes e impedir o efeito indesejável de sua cristalização em produtos lácteos (POMERANZ, 1964).

A β -galactosidase catalisa não só a hidrólise de β -galactopiranosídeos, mas também reações de transgalactosilação (PRENOSIL et al., 1987) com a formação de galactooligosacarídeos, considerados fatores de crescimento para bifidobactérias intestinais, citadas como importantes para a manutenção da saúde humana (MITSUOKA, 1990).

Muitos pesquisadores têm estudado microrganismos produtores de β -galactosidase e purificado esta enzima para diversas aplicações (DUMORTIER et al., 1994; ONISHI et al., 1995; BERGER et al., 1995; ONISHI et al., 1996; PEREIRA et al., 1998; PEREIRA, 1999; SHAIKH et al., 1999; KIM e RAJAGOPAL, 2000; VAN LAERE et al., 2000; BOON et al., 2000; PERRIN et al., 2000; MOLLER et al., 2001; NAGY et al., 2001; BATRA et al., 2002; HUNG e LEE, 2002; FERNANDES et al., 2002; LEE et al., 2003). Sendo a seguir apresentados alguns destes trabalhos.

A β -galactosidase de *Escherichia coli* ML 309, foi a primeira a ser obtida na forma pura e cristalina, é utilizada para estudar o mecanismo de ação das β -galactosidases e empregada na investigação do mecanismo específico na síntese de proteínas e no seu controle genético (WALLENFELS e MALHOTRA, 1961).

DUMORTIER e colaboradores em 1994 purificaram β -galactosidase de *Bifidobacterium bifidum*. A β -galactosidase foi extraída da por tratamento com ultrassom na presença de Triton X-100. A enzima mostrou ser homogênea em

eletroforese PAGE nativa e em SDS-PAGE apresentou quatro bandas com 163, 170, 178 e 190 kDa, seu peso molecular foi estimado em 362 kDa e o pI foi 5,25. A enzima purificada apresentou atividade ótima à 37°C e pH 6,5 para o substrato lactose e foi estável a temperaturas abaixo de 45°C e a valores de pH entre 6,5 e 8,0 (DUMORTIER et al., 1994).

ONISHI e TANAKA em 1995 purificaram a β -galactosidase termoestável de *Sterigmatomyces elviae* CBS8119, seu peso molecular foi estimado em 170 kDa por gel filtração e 86 kDa por eletroforese. O pH e temperatura ótima para a atividade da enzima foi 4,5 e 85°C, respectivamente, sendo estável a temperaturas superiores a 80°C por 1 hora e em valores de pH entre 2,5 a 7,0 (ONISHI e TANAKA, 1995).

A β -galactosidase extracelular de *Rhizomucor* sp foi purificada por cromatografia em DEAE-celulose e gel filtração em Sephacryl S-300. O peso molecular da enzima nativa foi de 250 KDa e apresentou duas subunidades idênticas de 120 KDa. O pH e temperatura ótima de atividade foi de 4,5 e 60°C, respectivamente. A enzima foi estável à 60°C por 4 horas (SHAIKH et al., 1999).

A β -galactosidase de *Bifidobacterium adolescentis* foi purificada por cromatografia de troca iônica, de adsorção e de exclusão. A enzima apresentou peso molecular de 350 e 89 KDa por filtração em gel e SDS-PAGE, respectivamente, indicando ser um tetrâmero e sua atividade ótima foi em pH 6,0 e 35°C (VAN LAERE et. Al, 2000).

NAGY e colaboradores em 2001 purificaram a β -galactosidase de *Penicillium chrysogenum* por precipitação com sulfato de amônio, cromatografia de troca iônica em DEAE-Sephadex e cromatografia de afinidade, obtendo uma purificação de cerca de 66 vezes (NAGY et al., 2001).

O *Scopulariopsis* sp utilizado neste trabalho foi encontrado no solo e selecionado entre 1067 cepas de fungos como o maior produtor de β -galactosidase, sendo cultivado para produção da enzima em farelo de trigo. A β -

galactosidase de *Scopulariopsis* sp apresentou-se termooestável e muito ativa em condições ácidas. Assim esta enzima tem potencial para solucionar problemas sérios da disposição do soro ácido (PASTORE e PARK, 1979).

Em 1980 PASTORE e PARK purificaram e caracterizaram a enzima β -galactosidase extracelular do *Scopulariopsis* sp. A purificação foi realizada por fracionamento com sulfato de amônio, diálise e cromatografia em colunas de DEAE-celulose e CM-celulose. Por eletroforese a enzima apresentou-se homogênea e seu peso molecular foi estimado em 95 kDa. O pH ótimo de atividade esteve na faixa de 3,6 a 5 e a enzima foi estável na faixa de pH compreendida entre 3,8 e 8,5. A temperatura ótima encontrada foi de 65°C e manteve sua atividade em 80% após 35 horas de incubação a 60°C (PASTORE e PARK, 1980).

Em 1981 a β -galactosidase de *Scopulariopsis* sp foi caracterizada após ser imobilizada em DEAE-celulose com glutaraldeído e comparada com a enzima imobilizada em resina de fenol-formaldeído (Duolite). A atividade da enzima no sobrenadante após a imobilização, foi de 8,8 e 5,4 unidades para DEAE-celulose e Duolite, respectivamente. Indicando que 58,5% da enzima foi adsorvida em DEAE-celulose enquanto a Duolite absorveu 73% da enzima. Porém, a enzima imobilizada em DEAE-celulose mostrou-se seis vezes mais ativa que em Duolite. Quanto a estabilidade térmica, após 80 horas de incubação, a atividade remanescente da enzima imobilizada em DEAE-celulose foi 14% e 80% em 60°C e 55°C, respectivamente. E a estabilidade frente ao pH foi observada entre valores de 4,0 e 5,0, sendo estes mesmos valores encontrados para pH ótimo. Foi realizada uma operação contínua de hidrólise de lactose por β -galactosidase imobilizada em DEAE-celulose, sendo considerada satisfatória para soro ácido em altas temperaturas. A coluna manteve a atividade da enzima por 20 dias com perda de 20% da atividade. O rendimento de β -galactosidase imobilizada em DEAE-celulose foi considerado baixo e quando imobilizada em Duolite ainda menos satisfatório, havendo necessidade de mais investigações para encontrar melhores condições (PARK e PASTORE, 1981).

Em 1998 foi estudada a adsorção da β -galactosidase de *Scopulariopsis* sp em resina aniônica Accel® Plus QMA, sendo acompanhada por um método de monitoramento contínuo (PEREIRA et al., 1998). A enzima foi analisada quanto ao fator de concentração e de purificação, quando submetida às operações de adsorção e eluição em leitos fixos e uma etapa final de purificação em filtração em gel, sendo obtido um fator de purificação de 3,3 vezes para a β -galactosidase de *Scopulariopsis* sp (PEREIRA, 1999).

Em 1999 foi desenvolvido um trabalho para a produção de β -galactosidase de *Scopulariopsis* sp por fermentação em substrato sólido (FSS), utilizando sistema de colunas de Raimbault, que minimiza a dificuldade de dissipação de calor, gerado pelo metabolismo microbiano, do substrato sólido e possibilita a condução de fermentação em diversas condições experimentais simultaneamente. Foram estudados os parâmetros: tempo de fermentação, concentração de esporos, vazão de ar e umidade em base seca em uma série de experimentos por planejamento fatorial. A variação da concentração de esporos do inóculo e a vazão de ar apresentaram menos influência na atividade enzimática, a umidade inicial do substrato foi o parâmetro de maior influência e o tempo de fermentação foi muito importante. A produtividade da enzima diminui após 96 horas de fermentação. O sistema de fermentação em colunas de Raimbault mostrou eficiente controle operacional e boa reprodutibilidade, apresentando melhora na produção enzimática em relação a atividade obtida quando o fungo foi produzido em frascos (MORAES, 1999).

O presente trabalho tem por objetivo purificar β -galactosidase de *Scopulariopsis* sp em FPLC (Fast protein liquid chromatograph) e caracterizá-la bioquimicamente.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Fonte de enzima

Como fonte de enzima foi utilizado o fungo *Scopulariopsis* sp isolado por PASTORE e PARK (1979), depositado na American Type Culture Collection (ATCC) sob o número 44206.

2.2 PRODUÇÃO DE β -GALACTOSIDASE

O fungo foi produzido por fermentação semi-sólida, cultivado em farelo de trigo e água na proporção de 1:1 (p/v). Em frascos Erlenmeyer de 500 mL, contendo 20g de substrato e esterilizado à 121°C por 20 minutos, foi adicionada uma suspensão de esporos (10^8 esporos/mL) e incubado a 30°C por 7 dias. Após o crescimento foi adicionado 100 mL de água destilada e o meio triturado com bastão de vidro para liberação da enzima. O extrato bruto foi obtido por filtração em papel whatman n.1 e tratado com sulfato de amônio a 80%. O precipitado obtido foi dialisado contra água, centrifugado e liofilizado, sendo armazenado à -18°C e denominado de enzima bruta.

2.3 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE β -GALACTOSIDASE

A atividade da β -galactosidase (EC 3.2.1.23 β -galactosídeo galactohidrolase) foi determinada usando *o*-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo (ONPG) como substrato. O meio de reação constou de 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, sendo a mistura incubada a 60°C por 15 minutos. A reação foi paralisada com 0,15 mL de carbonato de sódio a 10% e o produto da reação foi medido a 420 nm, contra branco. Uma unidade de atividade de β -galactosidase foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 μ mol de *o*-nitrofenol por minuto em 1 mL, nas condições de ensaio.

2.4 Purificação

A enzima bruta liofilizada foi ressuspensa em água, filtrada em membrana com porosidade de 0,22µm e aplicada em coluna catiônica SP Sepharose pré-equilibrada com tampão acetato de sódio pH 5,5 a 0,1M. Foi utilizado equipamento FPLC (Fast Protein Liquid Chromatograph) Pharmacia, com coluna de 5 mL de capacidade. A proteína foi eluída com gradiente em patamares de 30% e 40% de NaCl a 1M preparado no mesmo tampão, num fluxo de 5 mL/min. Foram coletadas frações de 2,5 mL, sendo a fração de 20 mL a que apresentou maior atividade enzimática.

Esta fração foi aplicada em coluna de filtração em gel Sephacryl S-200 de 120 mL, em FPLC, foram coletadas frações de 2,4 mL com fluxo de 0,3 mL/min. As frações com maior atividade de β -galactosidase foram reunidas (50,4 mL), dialisadas e utilizadas para a caracterização bioquímica.

2.5 Determinação de proteínas

A determinação de proteínas foi realizada pelo método proposto por LOWRY (1951), utilizando como padrão soro albumina bovina. As amostras foram previamente dialisadas. Nas frações cromatográficas as proteínas foram determinadas por absorbância a 280 nm.

2.6 Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS (SDS-PAGE)

As amostras foram incubadas em banho-maria fervente por 5 minutos na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS) e 2- β -mercaptoetanol, e aplicadas em gel de poliacrilamida com SDS a 12,5%, de acordo com o método de LAEMMLI (1970). A corrida eletroforética foi realizada em equipamento Pharmacia Biotech SE250 Phastsystem, e as proteínas foram coradas com Azul de Coomassie Brilhante R-250. Foram utilizados padrões de peso molecular de 14,4; 20,1; 30; 45; 66 e 97 KDa.

2.7 Determinação do peso molecular

O peso molecular da enzima β -galactosidase foi estimado por filtração em gel com coluna Sephacryl S-200, em FPLC. Foi utilizado Azul dextrana para determinação do volume vazio e padrões de peso molecular de 29, 43, 66, 150 e 200 KDa.

2.8 Caracterização bioquímica

2.8.1 Determinação do pH e temperatura ótimos de atividade de β -galactosidase

Para determinação do pH e temperatura ótimos para a atividade da enzima foi utilizado planejamento fatorial completo 2^2 , os níveis de estudo estão apresentados na tabela 3.1. A resposta ou a variável dependente foi a atividade de β -galactosidase determinada conforme descrito no item 2.3.

Tabela 3.1 – Fatores e níveis estudados no planejamento experimental fatorial de 2 níveis para pH e temperatura ótimos de atividade

Fatores	Níveis				
	-1,41	-1	0	+1	+1,41
pH	3,0	3,5	4,5	5,5	6,0
Temperatura (°C)	46	50	60	70	74

2.8.2 Determinação do pH e temperatura de estabilidade da β -galactosidase

Para determinação do pH e temperatura de estabilidade para a atividade da enzima foi utilizado planejamento fatorial completo 2^2 . A atividade de β -galactosidase foi determinada (item 2.3) após a incubação em diferentes valores de pH e temperatura (tabela 3.2) por 24 horas.

Tabela 3.2 – Fatores e níveis estudados no planejamento experimental fatorial de 2 níveis para pH e temperatura de estabilidade

Fatores	Níveis				
	-1,41	-1	0	+1	+1,41
pH	2,9	3,5	5,0	6,5	7,1
Temperatura (°C)	35,9	40	50	60	64,1

2.8.3 Determinação de Km e Vmax

Para a determinação da constante de Michaelis (Km) foi usado ONPG como substrato. A enzima β -galactosidase foi incubada com diferentes concentrações de ONPG, variando de 0,0625 a 10mM e a atividade foi medida como descrito no item 2.3. Para se obter Km e velocidade máxima (Vm) foi utilizado o método gráfico de Lineweaver-Burk (LINEWEAVER e BURK, 1934).

2.8.4 Efeito de agentes químicos

Foram testados os efeitos dos sais minerais HgCl_2 , FeSO_4 , CoCl_2 , K_2SO_4 , Na_2SO_4 , NaCl , ZnSO_4 , FeCl_3 , MnSO_4 , MgSO_4 , CuSO_4 e CaCl_2 , nas concentrações de 1 e 10mM, na atividade da enzima. Foram também testados os efeitos dos inibidores EDTA, 2-mercaptoetanol, azida sódica, cloridrato de cisteína, ácido aminobenzóico, N-bromosuccinimida, bissulfito de sódio e iodoacetamida, nas concentrações de 1 e 10mM. A enzima foi incubada com cada um dos agentes por 1 hora à 30°C, e então medida sua atividade com o substrato ONPG (item 2.3).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Purificação parcial

O procedimento para a purificação da β -galactosidase está sumarizado na tabela 3.3. A enzima foi purificada 13 vezes a partir do extrato bruto, com um rendimento de 14%, o melhor fator de purificação foi obtido na etapa de precipitação com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a 80%.

Tabela 3.3 – Purificação parcial da β -galactosidase de *Scopulariopsis* sp

Passos da Purificação	Atividade (U/mL)	Proteína (mg/mL)	Ativ. específica (mg/mL)	Rendimento (%)	Fator de purificação
Extrato bruto	0,028	0,369	0,0759	100	1
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (80%)	4,270	0,364	11,7307	108	155,5
SP Sepharose	0,403	0,145	2,7774	26,72	36,6
Sephacryl S-200	0,178	0,181	0,9812	14,16	12,9

Os perfis cromatográficos das etapas de purificação da β -galactosidase utilizando SP Sepharose e Sephacryl S-200 estão apresentados nas figuras 3.1 e 3.2, respectivamente.

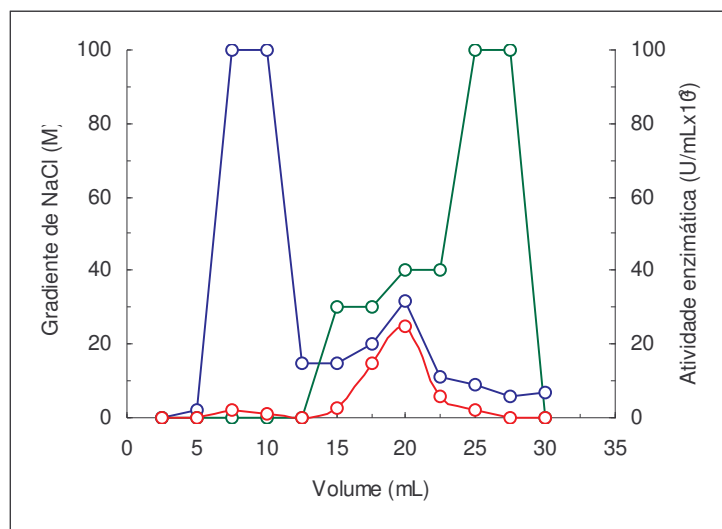


Figura 3.1 – Perfil cromatográfico da purificação de β -galactosidase de *Scopulariopsis* em coluna SP Sepharose. (-o-) proteína; (-o-) atividade de β -galactosidase; (-o-) gradiente de NaCl

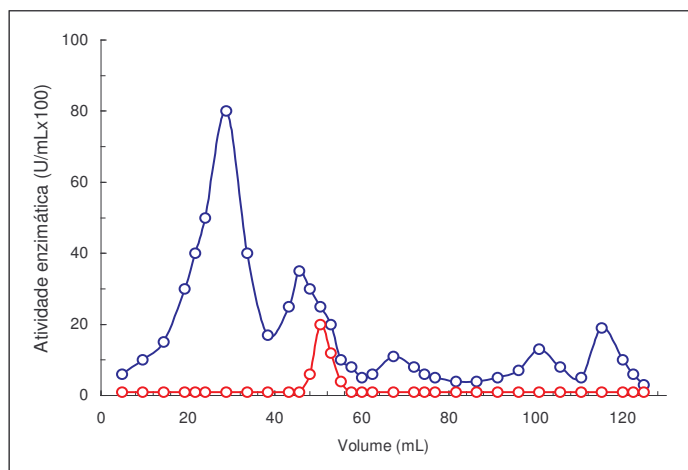


Figura 3.2 – Perfil cromatográfico da purificação de β -galactosidase de *Scopulariopsis* em coluna Sephacryl S-200. (-o-) proteína; (-o-) atividade de β -galactosidase

A enzima β -galactosidase tem característica aniônica, pois adsorveu em resina trocadora de íons do tipo catiônica (SP-Sepharose) e foi eluída com gradiente de NaCl.

3.2 Eletroforese SDS-PAGE

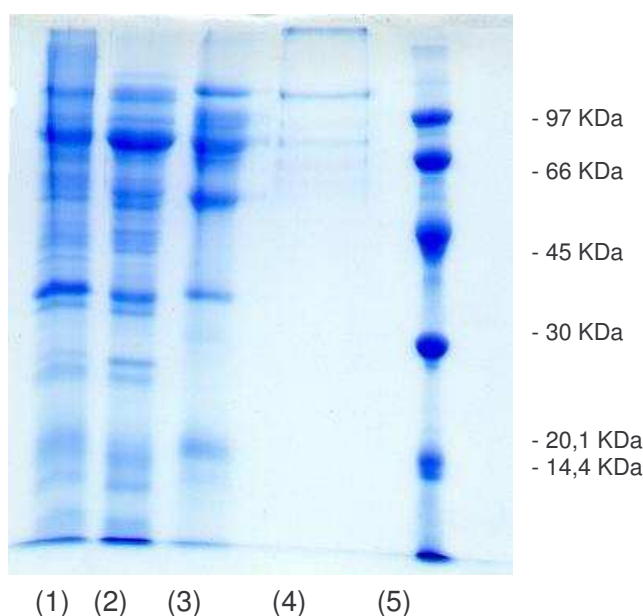


Figura 3.3 – SDS-PAGE das preparações enzimáticas durante as etapas de purificação da β -galactosidase. (1) extrato bruto. (2) preparação enzimática obtida por fracionamento com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a 80% de saturação. (3) preparação enzimática purificada por cromatografia em coluna de SP-Sepharose. (4) preparação enzimática purificada por cromatografia em coluna de Sephacryl S-200. (5) marcadores de PM em KDa

A eletroforese SDS-PAGE (figura 3.3) mostra uma banda mais forte um pouco acima do padrão de peso molecular de 97Kda. Possivelmente esta banda representa a enzima β -galactosidase, pois o seu peso molecular foi estimado em 98 KDa (item 3.3). Porém, pela eletroforese SDS-PAGE, a enzima não se apresentou na forma pura. PASTORE e PARK (1980) purificaram esta enzima utilizando coluna aberta de CM-celulose e estimaram seu peso molecular em torno

de 95 KDa, e confirmaram que a β -galactosidase de *Scopulariopsis* sp apresenta carga positiva.

3.3 Determinação do peso molecular

O peso molecular da β -galactosidase estimado pela filtração em gel Sephacryl S-200 foi de 98,38 KDa. A curva obtida (figura 3.4) foi $y = -1,265x + 3,6707$, onde $y = \log PM$ e $x = V_e/V_o$, com $R^2 = 0,902$.

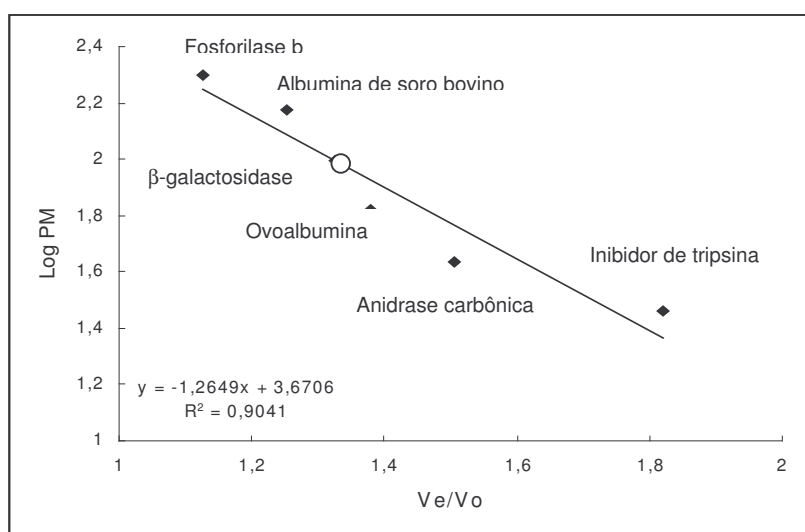


Figura 3.4 – Determinação de peso molecular da β -galactosidase de *Scopulariopsis* sp através da cromatografia em gel Sephacryl S-200

3.4 Caracterização bioquímica

Para o estudo do pH e temperatura ótima de atividade e de estabilidade da β -galactosidase de *Scopulariopsis* sp foi utilizado planejamento fatorial de dois níveis. Os resultados estão apresentados na tabela 3.4, toda a análise foi realizada com os valores das variáveis independentes codificados. A resposta considerada foi a atividade da β -galactosidase utilizando ONPG como substrato. As variáveis pH e temperatura e suas interações foram significativas a nível de 5%.

Tabela 3.4 – Matriz dos experimentos para planejamento experimental fatorial de dois níveis e a atividade de β -galactosidase em pH e temperatura ótima de atividade e de estabilidade

	pH	Temperatura	Atividade (U/mL.10 ³) para pH e T°C ótima de atividade	Atividade (U/mL.10 ³) para pH e T°C de estabilidade
1	-1	-1	11,0	8,0
2	+1	-1	30,0	18,6
3	-1	+1	0,0	1,5
4	+1	+1	0,0	0,1
5	-1,41	0	0,0	1,0
6	+1,41	0	14,0	3,2
7	0	-1,41	56,0	18,6
8	0	+1,41	12,0	0,2
9	0	0	64,0	18,4
10	0	0	61,0	18,0
11	0	0	54,0	18,4

3.4.1 Determinação do pH e temperatura ótima de atividade

Tabela 3.5 - Efeito do pH e temperatura na atividade de β -galactosidase

	Efeitos	Erro puro	t(2)	p
Média	59,706	2,962	20,152	0,0024
pH (Q)	-58,059	4,336	-13,389	0,0055
Temperatura (L)	-25,836	3,634	-7,109	0,1921
Temperatura (Q)	-30,897	4,336	-7,125	0,1913

Conforme a tabela 3.5 quando houve o aumento do nível -1 para +1, os efeitos do pH e temperatura na atividade enzimática foram negativos, indicando que a enzima apresentou melhor atividade em valores de pH mais ácidos e a

temperatura de 50°C foi melhor que 70°C. A maior atividade enzimática foi obtida com os valores dos pontos centrais (tabela 3.4), ou seja, em pH 4,5 a 60°C, o que pode ser comprovado analisando a figura 3.5.

Tabela 3.6 – Análise de variância (ANOVA) para pH e temperatura ótima de atividade

	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média Quadrática	Fcal	Ftab	Fcal/Ftab
Regressão	6350,5	3	2116,83	25,19	4,35	5,79
Resíduo	588,227	7	84,03			
Falta de ajuste	535,056	5				
Erro puro	52,667	2				
Total	6938,727	10				

$$R^2 = 0,9153$$

A análise de variância demonstra que o modelo é estatisticamente significativo com a relação Fcal/Ftab de 5,79; $p < 0,05$.

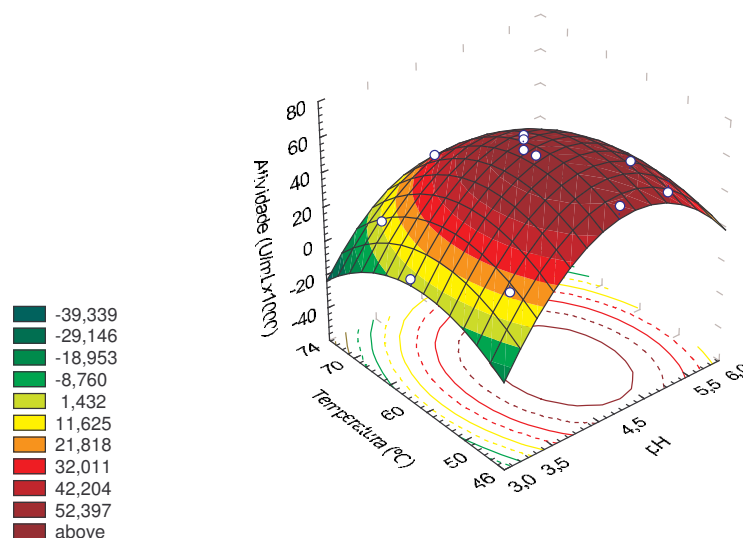


Figura 3.5 – Superfície de resposta do efeito do pH e temperatura na atividade da β -galactosidase de *Scopulariopsis* sp

Pode-se inferir que o pH ótimo de atuação da β -galactosidase de *Scopulariopsis* sp foi em torno de 4,5. Foi este mesmo valor o encontrado para esta enzima quando estudada por análise univariável (PASTORE e PARK, 1980); e também para β -galactosidase de *Rhizomucor* sp (SHAIKH et al., 1999). Os valores encontrados para outras β -galactosidas de outras fontes foram muito variáveis, como pH 6,0 para β -galactosidase de *Bifidobacterium adolescentis* e abaixo de pH 5,0 a enzima não apresentou atividade (VAN LAERE et al., 2000); para β -galactosidase de *Lactobacillus crispatus* o pH ótimo encontrado foi 6,5 (KIM e RAJAGOPAL, 2000); pH 4,0 para β -galactosidase de *Penicillium chrysogenum* (NAGY et al., 2001); para β -galactosidase de *Bacillus coagulans* o pico de atividade foi entre os valores de pH 6,0 e 7,0 (BATRA et al., 2002); pH 7,5 para β -galactosidase de *Bifidobacterium infantis* HL96 (HUNG e LEE, 2002); pH 9 para β -galactosidase de *Pseudoalteromonas* sp (FERNANDES et al., 2002).

A temperatura ótima da β -galactosidase de *Scopulariopsis* sp foi em torno de 60°C, sendo este valor confirmado por PASTORE e PARK (1980) que encontraram o valor de 65°C para esta enzima. A temperatura de 60°C também foi considerada ótima para β -galactosidase de *Rhizopus* sp (SHAIKH et al., 1999) e de *Bifidobacterium infantis* (HUNG e LEE, 2002); 65°C para β -galactosidase de *Bacillus coagulans* (BATRA et al., 2002); 45°C para β -galactosidase de *Lactobacillus crispatus*; 35°C para β -galactosidase de *Bifidobacterium adolescentis* (VAN LAERE et al., 2000); 30°C para β -galactosidase de *Penicillium chrysogenum* (NAGY et al., 2001).

3.4.2 Determinação do pH e temperatura de estabilidade

Tabela 3.7 - Efeito do pH e temperatura de estabilidade na atividade de β -galactosidase

	Efeitos	Erro puro	t(2)	p
Média	18,261	0,133	136,960	0,00005
(1) pH (L)	3,084	0,163	18,861	0,00279
pH (Q)	-15,566	0,195	-79,766	0,00015
(2) Temperatura (L)	-12,774	0,163	-78,108	0,00016
Temperatura (Q)	-8,222	0,195	-42,135	0,00056
(1) e (2)	-6,000	0,230	-25,980	0,00147

Na análise dos efeitos das variáveis independentes mostrados na tabela 3.7 a variação do nível -1 para +1 foi positiva para o pH (L), indicando que em pH 6,5 a enzima foi mais estável que em pH 3,5; porém quando analisada a temperatura o efeito foi negativo, sendo 40°C melhor que 60°C para sua estabilidade. Conforme demonstrado no gráfico 3.6, a faixa de melhor temperatura de estabilidade está entre 40°C e 50°C e para o pH de estabilidade, valores em torno de pH 5,0.

Tabela 3.8 – Análise de variância (ANOVA) para efeito do pH e temperatura na estabilidade da β -galactosidase

	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	Fcal	Ftab	Fcal/Ftab
Regressão	740,504	5	148,100	85,954	5,05	17,02
Resíduo	8,616	5	1,723			
Falta de ajuste	8,510	3				
Erro puro	0,160	2				
Total	749,120	10				

$$R^2 = 0,9884$$

A análise de variância demonstra que o modelo é estatisticamente significativo com a relação Fcal/Ftab de 17,02; $p < 0,05$.

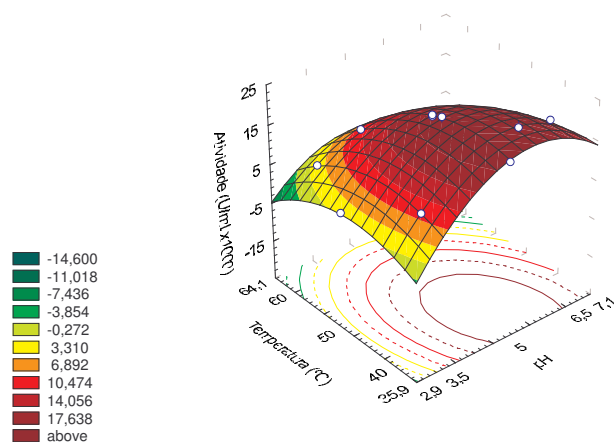


Figura 3.6 – Superfície de resposta do efeito do pH e temperatura na estabilidade da β -galactosidase de *Scopulariopsis* sp

A β -galactosidase de *Scopulariopsis* sp apresentou melhor estabilidade em torno de pH 5,0, para a β -galactosidase, este mesmo valor foi encontrado (capítulo 2, figura 2.6) quando determinado o pH de estabilidade da enzima bruta por análise univariável, onde a β -galactosidase manteve 100% de sua atividade por 24 horas em pH 5,0. PASTORE (1982) encontraram uma faixa de estabilidade com

valores de pH entre 3,8 a 8,5 após 24 horas de incubação a temperatura ambiente para a β -galactosidase de *Scopulariopsis* sp. Nos valores de pH entre 2,5 e 7,0 a β -galactosidase de *Sterigmatomyces elviae* manteve-se estável (ONISHI e TANAKA, 1995). A β -galactosidase de *Lactobacillus crispatus* apresentou estabilidade entre os valores de pH 6,0 e 7,0 (KIM e RAJAGOPAL, 2000); para β -galactosidase de *Bacillus coagulans* foram encontrados os valores de pH entre 5,0 e 8,0 (BATRA et al., 2002); e valores de pH entre 5,0 e 8,0 para a estabilidade de β -galactosidase de *Bifidobacterium infantis* (HUNG e LEE, 2002).

Após 24 horas a β -galactosidase de *Scopulariopsis* sp mostrou-se estável a temperaturas em torno de 40°C e quando exposta à 60°C em pH 6,5 (tabela 3.4, ensaio 4) apresentou inativação de 99%. Quando analisada a enzima bruta (capítulo 2, figura 2.7) manteve-se 85% de sua atividade após exposição à 50°C neste mesmo tempo. Quando incubada à 60°C por 35 horas a β -galactosidase manteve sua atividade em 80%, com uma rápida inativação à 65°C (PASTORE e PARK, 1980); a β -galactosidase de *Thermus aquaticus* manteve 80% de sua atividade entre 65 e 85°C (BERGER et al., 1997); a β -galactosidase de *Rhizomucor* sp foi estável a 60°C por 4 horas (SHAIKH et al., 1999); quando incubada a 45°C por 1 hora a β -galactosidase de *Lactobacillus crispatus* manteve sua atividade (KIM e RAJAGOPAL, 2000); β -galactosidase de *Bacillus coagulans* apresentou 50% de inativação quando mantida a 65°C por 2 horas e quando exposta a 63°C manteve sua atividade por 15 horas (BATRA et al., 2002). Alguns trabalhos relatados na literatura apresentam temperaturas mais altas para a estabilidade de β -galactosidase do que a do presente estudo, porém sempre em tempos menores de exposição.

3.4.3 Determinação de Km e Vmax

O efeito da concentração de substrato através da cinética de Michaelis-Menten e a representação gráfica da constante de Michaelis (Km) e velocidade máxima (Vmax) de acordo com LINEWEAVER e BURK (1934) estão apresentados nas figuras 3.7 e 3.8, respectivamente. Pelos cálculos com a

equação da reta a β -galactosidase de *Scopulariopsis* sp apresentou $K_m = 2,28\text{mM}$ e $V_{max} = 123\mu\text{moles/mL/min}$.

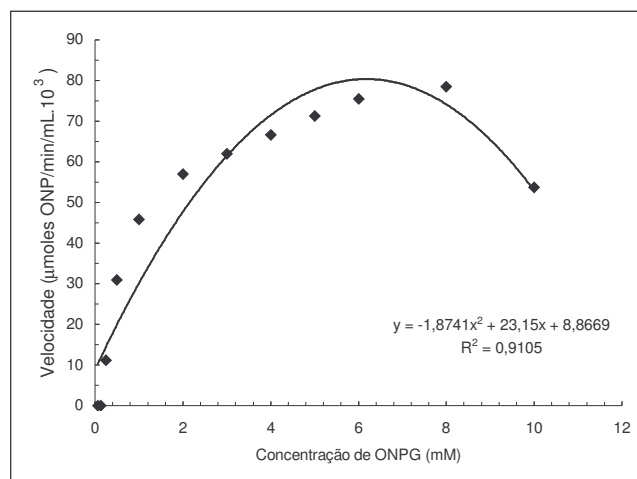


Figura 3.7 – Efeito da concentração do ONPG na atividade da β -galactosidase de *Scopulariopsis* sp

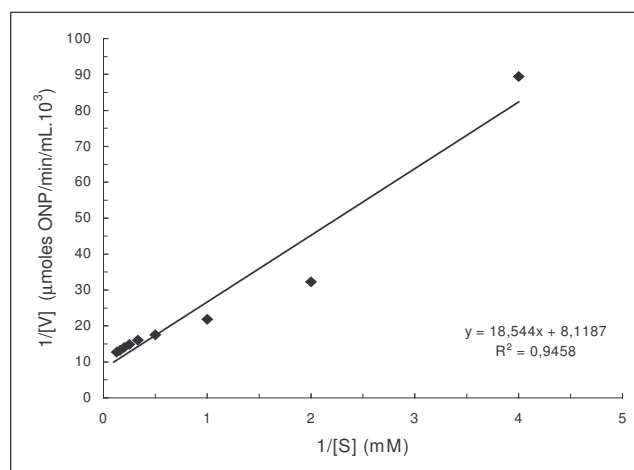


Figura 3.8 – Determinação gráfica dos valores de K_m e V_{max} da β -galactosidase de *Scopulariopsis* sp, de acordo com Lineweaver-Burk

A β -galactosidase de *Scopulariopsis* sp apresentou comportamento cinético de Michaelis-Menten, com um K_m de 2,28 mM para o substrato ONPG,

considerado o melhor substrato para esta enzima (WALLENFELS e MALHOTRA, 1961). Para o substrato ONPG a β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* apresentou um Km de 1,7 (CAVAILLE ET AL., 1995); para β -galactosidase de *Rhizomucor* sp apresentou um Km de 1,32 mM (SHAIKH et al., 1999); para β -galactosidase de *Lactobacillus crispatus* de 1,16 mM (KIM e RAJAGOPAL); o valor de Km de 1,81 para β -galactosidase de *Penicillium chrysogenum* (NAGY et al., 2001); para β -galactosidase de *Bifidobacterium infantis* o valor de Km foi 2,6 mM (HUNG e LEE, 2002); ONISHI e TANAKA (1995) encontraram o valor de Km de 9,5 mM para β -galactosidase de *Sterigmatomyces elviae*, para β -galactosidase de *Sirobasidium magnum* um Km de 14,3 mM (ONISHI e TANAKA, 1997).

3.4.4 Efeito de agentes químicos

O efeito dos agentes químicos testados está apresentado na tabela 3.9.

Tabela 3.9 – Efeito de diferentes íons metálicos e inibidores na atividade da β -galactosidase de *Scopulariopsis* sp

Agentes químicos	Atividade relativa (%)	
	1mM	0,1mM
Controle	100	100
HgCl ₂	98,90	98,81
FeSO ₄	206,83	108,08
CoCl ₂	105,42	98,86
K ₂ SO ₄	100,97	99,34
Na ₂ SO ₄	100,91	99,94
NaCl	104,42	86,53
ZnSO ₄	107,74	92,54
FeCl ₃	209,35	96,49
MnSO ₄	175,62	92,59
MgSO ₄	104,32	116,85
CuSO ₄	89,33	95,56
CaCl ₂	111,61	104,86
EDTA	95,56	135,75
2- β -mercaptoetanol	104,74	110,56
azida sódica	100,29	101,34
cloridrato de cisteína	106,92	95,49
ácido aminobenzóico	94,52	88,75
N-bromosuccinimida	1,32	0,00
bissulfito de sódio	93,49	78,57
iodoacetamida	97,56	84,52

Entre as sais testados o FeSO_4 , FeCl_3 e o MnSO_4 , na concentração de 1 mM, promoveram aumento na atividade enzimática de cerca de 106%, 109% e 75% respectivamente. Os íons ferro e manganês também foram encontrados como ativadores para β -galactosidase de *E. coli* (WALLENFELS e MALHOTRA, 1961); para β -galactosidase de *Lactobacillus crispatus* (KIM e RAJAGOPAL, 2000) e a β -galactosidase de *Pseudoalteromonas* sp foram ativadas por Mn^{+2} e também por Na^+ , K^+ e Mg^{+2} . (FERNANDES et al., 2002).

CoCl_2 , NaCl , ZnSO_4 , MgSO_4 e CaCl_2 na concentração de 1 mM ativaram levemente a β -galactosidase de *Scopulariopsis* sp e na concentração de 0,1 mM praticamente não tiveram ação, com exceção do MgSO_4 e CaCl_2 que também elevaram levemente a atividade enzimática.

Com os sais HgCl_2 , K_2SO_4 , Na_2SO_4 a β -galactosidase de *Scopulariopsis* sp não apresentou alteração significativa de atividade em ambas as concentrações estudadas, porém o CuSO_4 inibiu a atividade enzimática em 11% e 5% nas concentrações de 1 e 0,1 mM, respectivamente.

O EDTA (ácido etilenodiamino tetracético) ativou em 35% a atividade da β -galactosidase de *Scopulariopsis* sp quando na concentração de 0,1 mM. O 2- β -mercaptoetanol ativou a enzima em 4% na concentração de 1 mM e 10%, com 0,1 mM. Cloridrato de cisteína apresentou um aumento leve da atividade enzimática com 1 mM e leve queda com 0,1 mM. A azida sódica não teve interferência na atividade da β -galactosidase de *Scopulariopsis* sp. Ácido aminobenzóico, bissulfito de sódio e iodoacetamida inibiram a atividade enzimática em 8, 7 e 3%, respectivamente, quando utilizada a concentração de 1 mM; e 12, 22 e 16%, com 0,1 mM. N-bromosuccinimida inibiu fortemente a enzima β -galactosidase de *Scopulariopsis* sp, perdendo 99% sua atividade com 1 mM e com 0,1 mM foi totalmente inativada. Este inibidor modifica os aminoácidos triptofano, histidina e tirosina (WHITAKER, 1994), assim provavelmente um destes aminoácidos ou todos façam parte do sítio ativo da enzima, sendo essenciais para a manutenção de sua atividade.

4. CONCLUSÕES

A β -galactosidase de *Scopulariopsis* sp foi purificada cerca de 13 vezes a partir do extrato bruto, com um rendimento de 14% e apresentou característica aniônica.

A preparação enzimática obtida por fracionamento com sulfato de amônio 80%, cromatografia em coluna trocadora de íons e filtração em gel não se apresentou na forma pura.

O peso molecular estimado por filtração em gel foi de 98,38 KDa.

Na caracterização bioquímica da enzima o pH e a temperatura ótimos para a atividade da β -galactosidase foram em torno de 4,5 e 60°C, respectivamente.

A melhor estabilidade para a enzima foi com valores de pH em torno de 5,0 e temperaturas ao redor de 40°C.

A enzima apresentou comportamento cinético de Michaelis-Menten, com Km de 2,28 mM e Vmax de 123 μ moles/mL/min para o substrato ONPG.

Os íons Fe^{+2} , Fe^{+3} e Mn^{+2} na concentração de 1mM ativaram a β -galactosidase de *Scopulariopsis* sp, sugerindo que possam fazer parte do seu sítio ativo. E a enzima foi totalmente inativada em presença de N-bromosuccinimida na concentração de 0,1 mM.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BATRA, N.; SINGH, J.; BANERJEE, U. C.; PATNAIK, P. R.; SOBTI, R. C. Production and characterization of a thermostable β -galactosidase from *Bacillus coagulans* RCS3. **Biotechnology Applied Biochemistry**. v. 36, part1, p. 1-6, 2002.

BERGER, J.L.; LEE,B.H.; LACROIX, C. Oligosaccharides synthesis by free and immobilized β -galactosidases from *Thermus aquaticus* YT-1. **Biotechnology Letters**. v.17, n. 10, p.1077-1080, 1995.

BERGER, J.L.; LEE,B.H.; LACROIX, C. Purification, properties and characterization of a high-molecular-mass β -galactosidase isoenzyme from *Thermus aquaticus* YT-1. **Biotechnology Applied and Biochemistry**. v.25, p.29-41, 1997.

BOON, M.A.; JANSSEN, A.E.M.; VAN'T RIET, K. Effect of temperature and enzyme origin on the enzymatic synthesis of oligosaccharides. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 26, p.271-281, 2000.

CAVAILLE, D.; COMBES, D. Characterization of beta-galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. **Biotechnology and Applied Biochemistry**. v. 22, n.1, p. 55-64, 1995.

DUMORTIER, V.; BRASSART, C. BOUQUELET, S. Purification and properties of a β -D-galactosidase from *Bifidobacterium bifidum* exhibiting a transgalactosylation reaction. **Biotechnology Applied Biochemistry**. v. 19, p. 341-354, 1994.

FERNANDES, S.; GEUEKE, B.; DELGADO, O.; COLEMAN, J.; HATTI-KAUL, R. β -galactosidase from a cold-adapted bacterium: purification, characterization and application for lactose hydrolysis. **Applied Microbiology Biotechnology**. v. 58, n. 3, p. 313-21, 2002.

HUNG M. N.; LEE, B. H. Purification and characterization of a recombinant with transgalactosylation activity from *Bifidobacterium infantis* HL96. **Applied Microbiology Biotechnology**. v. 58, n. 4, p. 439-45, 2002.

KIM, J. W.; RAJAGOPAL, S. N. Isolation and characterization of β -galactosidase from *Lactobacillus crispatus*. **Folia Microbiol** (Praha). v. 45, n. 1, p. 29-34, 2000.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**. v. 227, p. 680-685, 1970.

LEE, D. H.; KANG, S. G.; SUH, S. G.; BYUN, J. K. Purification and characterization of a beta-galactosidase from peach (*Prunus persica*). **Mol Cells**. v. 15, n. 1, p. 68-74, 2003.

LINEWEAVER, H.; BURK, D. The determination of enzyme dissociation constants. **Journal American Chemistry**. v. 56, p. 658-666, 1934.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Proteins measurement with the Folin-phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**. v. 193, p. 265-275, 1951.

MITSUOKA, T. *Bifidobacteria* and their role in human health. **Journal Industrial Microbiology**. v.6, p. 263-268, 1990,

MOLLER, P. L.; JORGENSEN, F.; HANSEN, O. C.; MADSEN, S. M.; STOUGAARD, P. Intra- and extracellular beta-galactosidases from *Bifidobacterium*

bifidum and *b. infantis*: molecular cloning, heterologous expression, and comparative characterization. **Applied Environmental of Microbiology**. v. 67, n.5, p. 2276-83, 2001.

MORAES, R. O. **Estudo da produção de beta-galactosidase por fermentação em substrato sólido em colunas de Raimbault**. Campinas, 1999. 105p. Dissertação de mestrado, Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas.

NAGY, Z.; KISS, T.; SZENTIRMAI, A.; BIRO, S. β -galactosidase of *Penicillium chrysogenum*: production, purification and characterization of the enzyme. **Protein Expr Purif**. v. 21, n. 1, p. 24-9, 2001.

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.

ONISHI, N.; TANAKA, T. Purification and properties of a novel thermostable galacto-oligosaccharide producing β -galactosidases from *Sterigmatomyces elviae* CBS8119. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 61, n.11, p.4026-4030, 1995.

ONISHI, N.; TANAKA, T. Purification and characterization of galacto-oligosaccharide-producing β -galactosidase from *Sirobasidium magnum*. **Letters in Applied Microbiology**. v. 24, p. 82-86, 1997.

PARK, Y.K.; PASTORE, G.M. Immobilization of *Scopulariopsis* β -galactosidase to DEAE-cellulose with glutaraldehyde and some properties of the preparation obtained. . **Journal of Fermentation Technology**. v.59, n.2, p.165-168, 1981.

PASTORE, G. M. **Produção, purificação, estudos das propriedades e aplicação da β -galactosidase de *Scopulariopsis* sp.** Campinas, 1982. 87p. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola, Universidade Estadual de Campinas.

PASTORE, G.M. PARK, Y.K. Purification and characterization of β -galactosidase from *Scopulariopsis* sp. **Journal of Fermentation Technology**. v.58, n.1, p.79-81, 1980.

PEREIRA, J. A. M.; ROSA, P. D. V. E.; PASTORE, G. M.; SANTANA, C. C. Expanded-bed adsorption utilizing ion-exchange resin to purify extracellular beta-galactosidase. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v. 70-2, p. 779-787, 1998.

PEREIRA, J. A. M. **Adsorção de beta-galactosidase de *Scopulariopsis* sp em resina trocadora de íons objetivando a purificação e a ampliação de escala.** Campinas, 1999. 138p. Tese de doutorado, Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas.

PERRIN, V.; FENET, B.; PRALY, J.; LECROIX, F.; DUNG TA, C. Identification and synthesis of a trisaccharides produced from lactose by transgalactosylation. **Carbohydrate Research**. v. 325, p. 202-210, 2000.

POMERANZ, Y. Lactase (β -galactosidase). I – Occurrence and properties. **Food Technology**, v.88, p.682, 1964.

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

RICHMOND, M.L.; STINE, C.M. β -galactosidase: review of recent research related to technological applications, nutritional concerns, and immobilization. **Journal of Dairy Science**. v. 64, n. 9, p. 1579-1771, 1981.

SHAIKH, S. A.; KHIRE, J. M.; KHAN, M.I. Characterization of a thermostable extracellular β -galactosidase from a thermophilic fungus *Rhizomucor* sp. **Biochimical Biophysica Acta**. v. 1472 n.1-2, p. 314-22, 1999.

VAN LAERE, K. M.; ABEE, T.; SCHOLS H.A.; BELDMAN, G.; VORAGEN A. G. Characterization of a novel β -galactosidase from *Bidobacterium adolescentis* DSM 20083 active towards transgalactooligosaccharides. **Applied Environmental Microbiology**. v. 66, n. 4, p. 1379-84, 2000.

WALLENFELS, K.; MALHOTRA, O. P. Galactosidase. **Advances Carbohydrate Chemistry**. v. 16, p. 239-298, 1961.

WHITAKER, J.R. **Principles of Enzymology for the Food Sciences**. New York: Marcel Dekker, 1994, 624p.

CAPÍTULO 4

PRODUÇÃO DE GALACTOOLIGOSSACARÍDEOS POR β -GALACTOSIDASE DE *Scopulariopsis* sp

RESUMO

Uma cepa de *Scopulariopsis* sp produtora de β -galactosidase extracelular com alta atividade foi isolada do solo e utilizada neste estudo. A β -galactosidase é uma enzima usada industrialmente para a hidrólise da lactose de leite e soro de leite para diversas aplicações. Em altas concentrações de lactose a β -galactosidase tem atividade de galactosiltransferase, produzindo uma mistura de galactooligossacarídeos (GOS). Um dos efeitos benéficos da ingestão de galactooligossacarídeos é o aumento da população de bifidobactérias no cólon, que suprimem a atividade de bactérias putrefativas e reduzem a formação de produtos tóxicos por fermentação. A cepa de *Scopulariopsis* sp apresentou boa produtividade de β -galactosidase quando crescida em meio de fermentação semi-sólido. A temperatura ótima para atividade de galactosiltransferase foi entre 35 e 45°C e o efeito do pH foi mínimo em alta concentração de lactose; a concentração de enzima para síntese de GOS foi 4-6 U/mL. Quando uma solução de lactose a 40% (p/v) em 0,1 M de tampão acetato de sódio pH 4,5 a 45°C foi incubada com 6 U/mL de β -galactosidase, a enzima converteu 30% da lactose em oligossacarídeos (224,92 mg/mL de 4' galactosil lactose). Este produto apresenta potencialidade como ingrediente em alimentos com alto valor prebiótico.

SUMMARY

A strain of *Scopulariopsis* sp which produced high activity of extracellular β -galactosidase was isolated from soil and studied in this work. β -galactosidase is an enzyme used industrially for the hydrolysis of lactose from milk and milk whey for several applications. In high lactose concentrations the β -galactosidase has galactosyltransferase activity, producing a galactooligosaccharides (GOS) mixture. The benefits of galactooligosaccharides ingestion arise from population of

bifidobacteria in the colon that suppress the activity of putrefactive bacteria and reduce the formation of toxic fermentation products. *Scopulariopsis* strains showed good productivity of β -galactosidase when grown by semi-solid fermentation medium. The optimal temperature for galactosyltransferase activity was in the range of 35 to 45°C and the pH effect was minimal at high lactose concentration; the enzyme concentration for GOS synthesis was 4-6 U/mL. When 40% (w/v) lactose solution (in 0.1M sodium acetate buffer, pH 4.5, 45°C) was incubated with 6 U/mL of β -galactosidase, the enzyme converted 30% of the lactose in oligosaccharides (224.92 mg/mL of 4' galactosyl-lactose). This product shows potentiality as an food ingredient with high prebiotic value.

1. INTRODUÇÃO

Os oligossacarídeos são açúcares encontrados naturalmente em muitos alimentos como frutas, vegetais, leite e mel. Alguns deles não apresentam só a função nutricional ou de adoçante, mas também exibem atividade fisiológica, sendo assim denominados alimentos funcionais (NAKANO, 1998). Os oligossacarídeos são geralmente definidos como glicosídeos que contém entre três e dez monossacarídeos. Em geral quando incorporados nos alimentos não são puros, mas são uma mistura de diferentes oligossacarídeos com diferentes graus de polimerização (CRITTENDEN e PLAYNE, 1996).

Os galactooligossacarídeos 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., 1995). Também tem sido demonstrado que a ingestão de galactooligossacarídeos aumenta a absorção de cálcio (BROUNS e VERMEER, 2000). GOS são produzidos a partir da lactose por ação da β -galactosidase, quando esta se encontra em baixa concentração, ocorrendo sua hidrólise,

enquanto que os galactooligossacarídeos são sintetizados em alta concentração de lactose por atividade de transgalactosilação.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O microrganismo utilizado neste trabalho foi o fungo *Scopulariopsis sp* isolado por PASTORE e PARK (1979), depositado na American Type Culture Collection (ATCC) sob o número 44206.

2.1 PRODUÇÃO DE β -GALACTOSIDASE

O fungo foi cultivado em fermentação semi-sólida em meio farelo de trigo e água na proporção de 1:1 (p/v). Em frasco Erlenmeyer de 500 mL, contendo 20g de substrato e esterilizado à 121°C por 20 minutos, foi adicionada uma suspensão de esporos (10^8 esporos/mL). Após incubação à 30°C por 7 dias foi adicionado 100 mL de água destilada e o meio foi triturado com bastão de vidro para liberação da enzima, obtendo-se após filtração o extrato enzimático. Para a obtenção da β -galactosidase adicionou-se etanol resfriado a 8°C até concentração de 70%. O precipitado obtido foi espalhado em placa de vidro, raspado e recolhido em forma de pó.

2.2 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE β -GALACTOSIDASE

A atividade da β -galactosidase (EC 3.2.1.23 β -galactosídeo galactohidrolase) foi determinada usando *o*-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo (ONPG) como substrato. O meio de reação constou de 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, sendo a mistura incubada a 60°C por 15 minutos. A reação foi paralisada com 0,15 mL de carbonato de sódio a 10% e o produto da reação foi medido a 420 nm, contra branco. Uma unidade de atividade de β -galactosidase foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 μ mol de *o*-nitrofenol por minuto em 1 mL, nas condições de ensaio.

2.3 PRODUÇÃO DE GALACTOOLIGOSSACARÍDEOS

2.3.1 Efeito da concentração da enzima na produção de galactooligossacarídeos

O efeito da concentração de 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 5,5. Em todos os experimentos a reação foi paralisada por inativação da enzima em banho de ebulição por 10 minutos.

2.3.2 Efeito do pH na produção de galactooligossacarídeos

O efeito do pH foi avaliado em um sistema de reação contendo solução inicial de lactose a 20%, com valores de pH entre 3,5 a 8,5, e 6 U/mL de β -galactosidase a 45°C.

2.3.3 Efeito da temperatura na produção de galactooligossacarídeos

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 5,5 e 6 U/mL de β -galactosidase.

2.3.4 Curva de produção de galactooligossacarídeos

O perfil da produção de GOS em relação ao tempo foi realizado utilizando solução de lactose com concentração inicial de 40% em tampão acetato de sódio 0,1 M pH 5,5 e 6 U/mL de β -galactosidase à 45°C.

2.4 ANÁLISE DOS CARBOIDRATOS

Os produtos das reações foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), utilizando um cromatógrafo líquido Waters e coluna Supelcogel™ Ca (300x7,8mm), sendo usado água como solvente e um fluxo de 0,5 mL/min a 80°C. Os carboidratos foram detectados pelo índice de refração e identificados e quantificados por comparação com o tempo de retenção dos padrões de glicose, galactose, lactose e 4'galactosil-lactose.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Efeito da concentração da enzima na produção de galactooligossacarídeos

O efeito da concentração de β -galactosidase na síntese de GOS é apresentado nas figuras 4.1 e 4.2. Com as menores concentrações de enzima (0,5; 1 e 2 U/mL) ocorre aumento gradativo da síntese de GOS em relação ao tempo, e nas concentrações mais elevadas 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 a reação se processa rapidamente, e a partir de um certo patamar começa a diminuir o rendimento, talvez devido à inibição da reação por algum produto formado ou por hidrólise dos oligossacarídeos.

Após 24 horas de reação as concentrações de 4 e 6 U/mL β -galactosidase apresentaram maior produção de GOS. Com 0,5U/mL foi obtido o menor rendimento até 48 horas de reação e com 1U/mL houve a necessidade de mais tempo para se alcançar os mesmos níveis obtidos com 2 U/mL de enzima. Aumentando a concentração de β -galactosidase para 8 e 10U/mL não houve melhora no rendimento (figura 4.1), indicando que o aumento da concentração da enzima não é proporcional ao aumento da síntese de oligossacarídeos, e que a limitação da produção não está relacionada apenas com a concentração da enzima.

Quando observada a composição dos carboidratos (figura 4.2) 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).

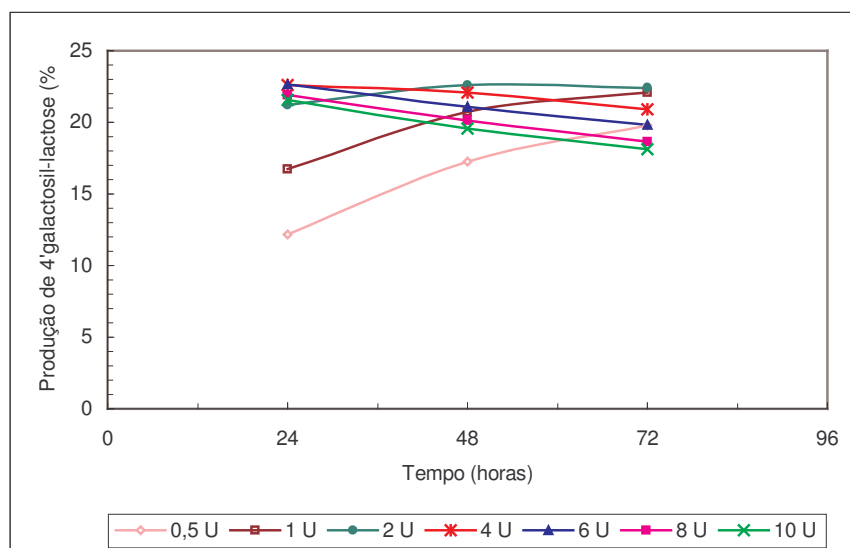


Figura 4.1 – Efeito da concentração de β -galactosidase e do tempo de reação na síntese de 4'galactosil-lactose, utilizando solução de lactose a 40% (p/v) em pH 5,5 à 45°C

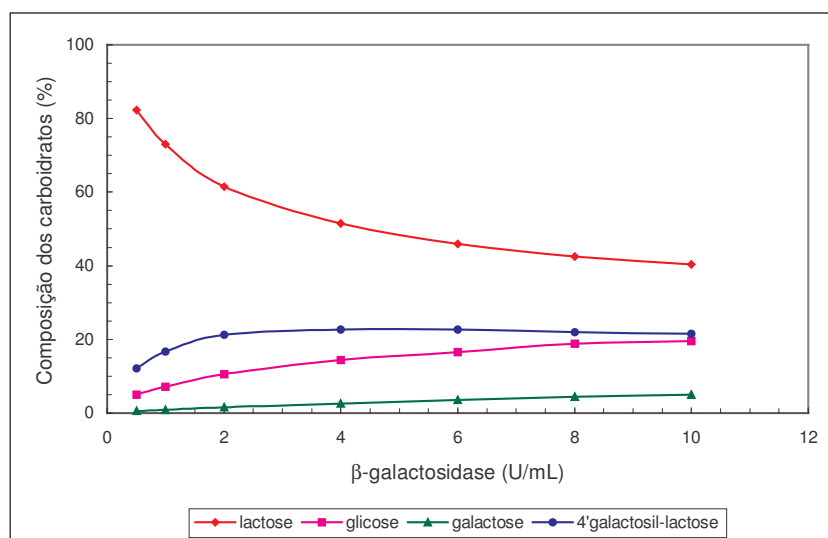


Figura 4.2 – Efeito da concentração de β -galactosidase na produção de 4'-galactosil-lactose, glicose e galactose a partir de solução de lactose 40% (p/v) em pH 5,5 à 45°C

3.2 EFEITO DO PH NA PRODUÇÃO DE GALACTOOLIGOSSACARÍDEOS

De acordo com a figura 4.3 o aumento do tempo de incubação levou a uma diminuição da produção de GOS em todos os ensaios. Em 24 horas de reação os sistemas com pH próximos da neutralidade foram melhores para a síntese de GOS. Porém em 6 horas de reação foram obtidos os maiores rendimentos, apesar de não serem observadas diferenças em relação aos valores de pH. IWASAKI et al. (1996) observaram que quando a concentração de lactose inicial era alta a conversão em oligossacarídeos não era influenciada pelo pH. Para PRENOSIL et al. (1987) a influência do pH e a força iônica não foram significativas, mas sim a concentração de lactose. Em 6 horas de reação (figura 4.4) ocorreu um aumento da lactose residual na faixa de pH 6,5 a 7,5 e uma queda na concentração dos monossacarídeos. A diminuição de glicose e galactose representa diminuição da atividade hidrolítica, que ocorre melhor em condições ácidas (dados não mostrados). Este efeito também tem sido observado por outros pesquisadores (KIKUCHI e ISHIWATA, 1993; CRUZ et al., 1999).

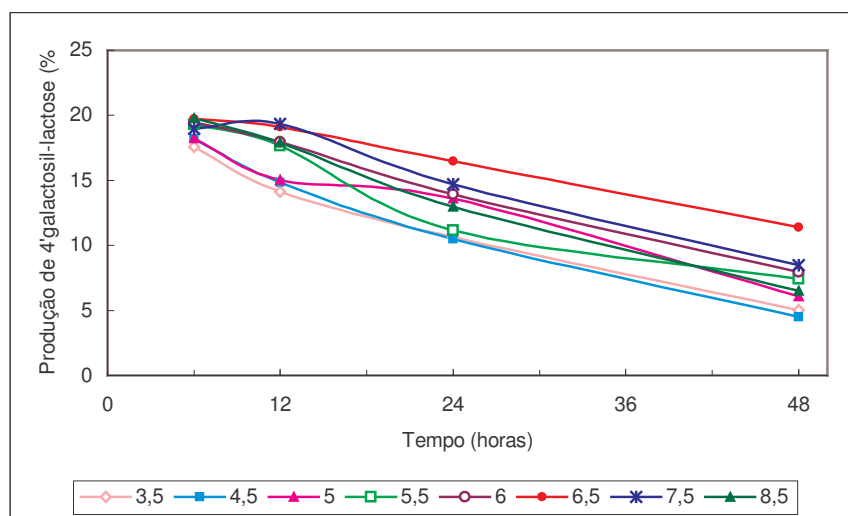


Figura 4.3 – Efeito do pH e do tempo de reação na síntese de 4'galactosil-lactose, a partir de solução de lactose 20% (p/v) à 45°C, utilizando 6U/mL de β -galactosidase

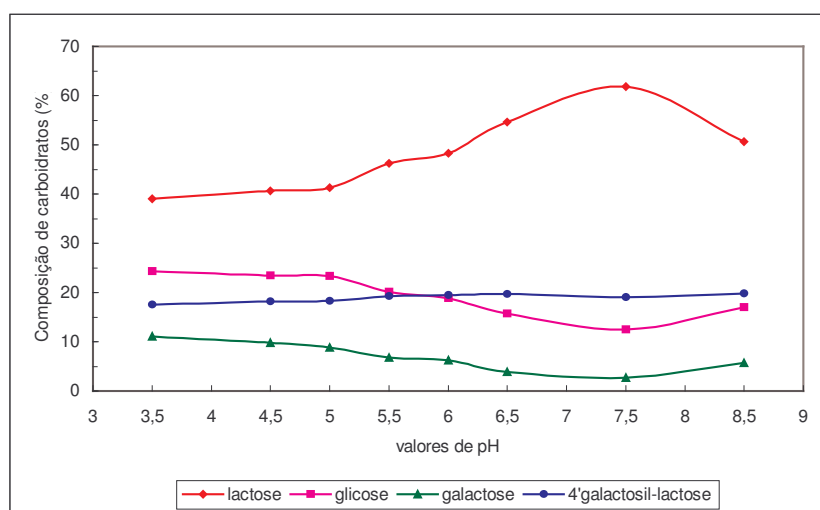


Figura 4.4 – Efeito do pH na produção de 4'galactosil-lactose, glicose e galactose a partir de solução de lactose 20% (p/v) à 45°C

3.3 EFEITO DA TEMPERATURA NA PRODUÇÃO DE GALACTOOLIGOSSACARÍDEOS

As figuras 4.5 e 4.6 mostram o efeito da temperatura na síntese de GOS. Quando relacionada com o tempo (figura 4.5) foi observado aumento da produção de GOS até 24 horas nos sistemas à 35, 40 e 45°C e neste mesmo tempo uma queda, para as temperaturas de 50, 55 e 60°C. Até 6 horas de reação temperaturas mais elevadas aceleraram a síntese de oligossacarídeos e em seguida ocorreu uma diminuição, talvez por hidrólise ou inibição do produto. Em 24 horas de reação a temperatura ótima para produção de GOS foi 35°C, quando 22,6% dos açúcares do meio são representados pelo 4'galactosil-lactose. Porém à 45°C ocorreu a formação de 21,2% deste trissacarídeo em apenas 6 horas de reação.

A figura 4.6 indica que quando ocorreu aumento na concentração dos monossacarídeos, principalmente glicose, houve uma diminuição na produção de GOS, demonstrando que a glicose inibe a ação de transferase de β -galactosidase (RUSTOM et al., 1998; PRENOSIL et al., 1987a; IWASAKI et al., 1996), e também demonstra que em temperaturas mais altas, próximo ao pH ótimo da β -galactosidase, ocorreu menor hidrólise da lactose em glicose e galactose.

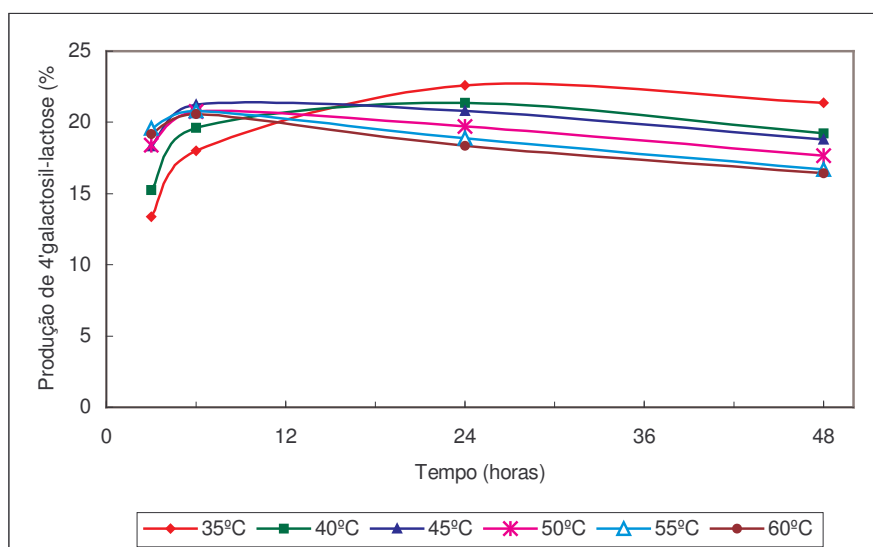


Figura 4.5 – Efeito da temperatura e do tempo de reação na síntese de 4'galactosil-lactose a partir de solução de lactose 40% (p/v) em pH 5,5, utilizando 6U/mL de β -galactosidas

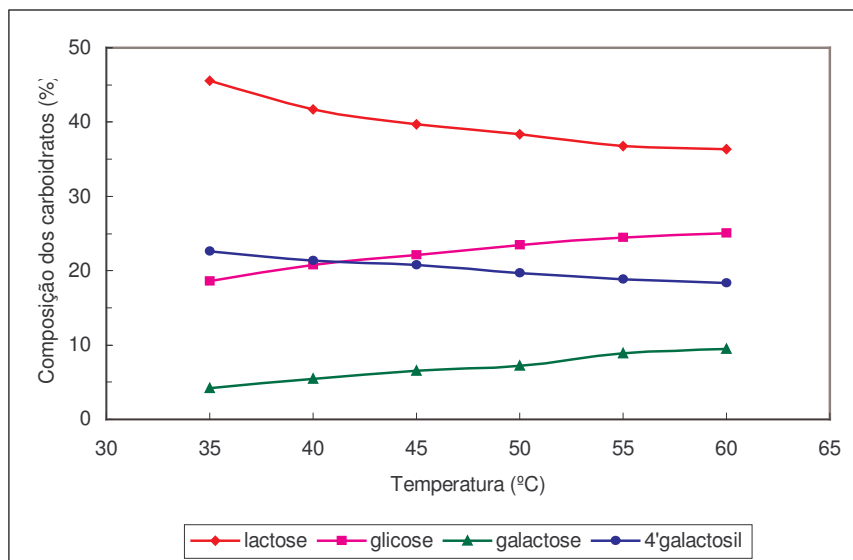


Figura 4.6 – Efeito da temperatura na produção de 4'galactosil-lactose, glicose e galactose a partir de solução de lactose 40% (p/v) em pH 5,5

3.4 CURVA DE PRODUÇÃO NA PRODUÇÃO DE GALACTOOLIGOSSACARÍDEOS

Para observar a síntese de GOS em relação ao tempo 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 (ALBAYRAK e YANG, 2002; IWASAKI et al., 1996; RUSTOM et al., 1997; SHIN e YANG, 1994)). Quanto maior a concentração de lactose no meio maior será a produção de GOS (LÓPEZ-LEIVA e GUZMAN, 1995). Como a lactose cristaliza facilmente em altas concentrações, a concentração de 40% foi considerada razoável para as condições de trabalho. Em processos industriais os sistemas ácidos e em altas temperaturas são mais interessantes, assim foram escolhidos os valores de pH 5,5 e temperatura de 45°C que apresentaram bons resultados para produção de GOS e estão mais próximos destas condições ideais.

A produção de galactooligossacarídeos manteve-se estável no período de 6 e 24 horas de reação. A partir de 24 horas houve uma tendência de diminuição da produção (figura 4.7), o que pode ser explicado pelo aumento da quantidade de glicose, considerada um inibidor da reação. Também por apresentarem maior

peso molecular que a lactose os oligossacarídeos podem ser preferencialmente hidrolisados (CRUZ et al., 1999; SMART, 1991). Neste período menor quantidade de galactose foi formada em relação a glicose, sugerindo que a enzima β -galactosidase de *Scopulariopsis* apresenta maior atividade de transgalactosilação que de hidrólise. Ocorreu a maior produção de GOS entre 9 e 12 horas de reação, onde foram produzidos 88mg/mL de 4'galactosil-lactose com uma conversão de 22% da lactose em galactooligossacarídeos.

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 *A. oryzae* imobilizada, reportaram um rendimento máximo de 14% de GOS, com 20-40% de conversão de lactose em GOS. IWASAKI e colaboradores (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 72 mg/mL de GOS após incubação em 20% de lactose, pH 5, 60°C por 24 horas. A utilização de lactose inicial a 14% e β -galactosidase de *A. oryzae* levou a 17,9% de oligossacarídeos, em pH 5 e 35°C (RUSTOM et al., 1998). SHIN e colaboradores (1998) produziram 160 mg/mL de GOS utilizando β -galactosidase de *B. singularis* em 30% de lactose à 45°C e pH 3,7.

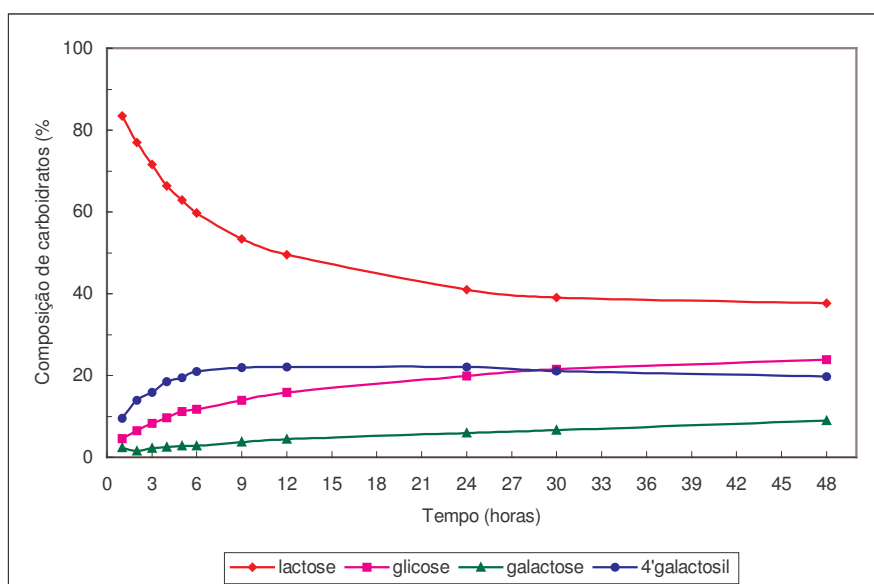


Figura 4.7 – Cinética de produção de galactooligossacarídeo. Utilizando lactose a 40% (p/v) em pH 5,5 e 6 U/mL de β -galactosidase

4. CONCLUSÕES

A β -galactosidase de *Scopulariopsis* sp apresentou atividade de transgalactosilação, sintetizando em maior quantidade o trissacarídeo 4'galactosil-lactose.

Os maiores rendimentos de produção de GOS foram obtidos com 6 U/mL de β -galactosidase, sendo que o aumento da concentração da enzima não é proporcional ao aumento da síntese de GOS.

O pH do sistema não teve influência na conversão da lactose em oligossacarídeos.

Temperaturas mais elevadas aceleraram a síntese de GOS nas primeiras horas, sendo obtido à 45°C com 6 horas de reação um rendimento próximo ao máximo, encontrado à 35°C em 24 horas de reação.

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 entre 9 e 12 horas de reação e uma conversão de 22% da lactose em galactooligossacarídeos.

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

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.

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, properties and applications of food-grade oligosaccharides. **Trends in Food Science & Technology**. v.7, n.11, p.353-361, 1996.

CRUZ, R.; CRUZ, V.D.; BELOTE, J.G.; KHENAYFES, M.O. DORTA, C.; OLIVEIRA, L.H.S.; ARDILES, E.; GALLI, A. Production of transgalactosylated oligosaccharides (TOS) by galactosyltransferase activity from *Penicillium simplicissimum*. **Bioresource Technology**. v. 70, p. 165-171, 1999.

ISHIKAWA, F.; TAKAYAMA, H.; MATSUMOTO, K.; ITO, M.; CHONAN, O.; DEGUCHI, Y.; KIKUCHI-HAYAKAWA, H.; WATANUKI, M. Effects of β 1-4 linked galacto-oligosaccharides on human fecal microflora. **Bifidus**. v.9, p. 5-18, 1995.

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.

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.

NAKANO, H. **Recente japanese development in the enzymatic production and application of oligosaccharides**; apresentado no Seminar on enzyme and bacterial technology, 1998, Campinas. Japan International Cooperation Agency, [s.d.].

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

ONISHI, N.; TANAKA, T. Purification and characterization of galacto-oligosaccharide-producing β -galactosidase from *Sirobasidium magnum*. **Letters in Applied Microbiology**. v. 24, p. 82-86, 1997.

PASTORE, G.M.; PARK, Y.K. Screening of high β -galactosidase-producing fungi and characterizing the hydrolysis properties of a selected strain. **Journal of Food Science**. v. 44, p. 1577-1579, 1979.

PERRIN, V.; FENET, B.; PRALY, J.; LECROIX, F.; DUNG TA, C. Identification and synthesis of a trisaccharides produced from lactose by transgalactosylation. **Carbohydrate Research**. v. 325, p. 202-210, 2000.

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

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.

SHIN, H.; YANG, J. Galacto-oligosaccharide production by β -galactosidase in hydrophobic organic media. **Biotechnology Letters**. V. 16, n.11, p.1157-1162, 1994.

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.

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

CAPÍTULO 5

SÍNTESE DE GALACTOOLIGOSSACARÍDEOS POR β -GALACTOSIDASE DE *Scopulariopsis* sp UTILIZANDO METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA

RESUMO

A β -galactosidase é usada industrialmente para a hidrólise da lactose de leite e soro de leite para diversas aplicações. Em altas concentrações de lactose tem atividade de galactosiltransferase, produzindo uma mistura de galactooligossacarídeos. Como efeito benéfico pela ingestão de galactooligossacarídeos ocorre aumento da população de bifidobactérias no cólon, que suprimem a atividade de bactérias putrefativas e reduz a formação de produtos tóxicos por fermentação. Foi utilizado planejamento fatorial completo de 2 níveis para estudar o efeito da enzima (4,0 e 8,0 U/mL), pH (5,0 e 7,0) e temperatura (35°C e 45°C) na formação enzimática de galactooligossacarídeos a partir da lactose. A diminuição da concentração de enzima e da temperatura, e um aumento do valor de pH resultou em maior produção de galactooligossacarídeos. O produto obtido em maior quantidade foi identificado como 4'-galactosil-lactose por cromatografia líquida de alta eficiência.

SUMMARY

β -galactosidase is used industrially for the hydrolysis of lactose from milk and milk whey for several applications. In high lactose concentrations the enzyme has galactosyltransferase activity, producing a galactooligosaccharides (GOS) mixture. The benefits of galactooligosaccharides ingestion arise from population of bifidobacteria in the colon that suppress the activity of putrefactive bacteria and reduce the formation of toxic fermentation products. Two-level full-factorial design experiments were designed to study effects of enzyme (4.0 and 8.0 U/mL), pH (5.0 and 7.0) and temperature (35°C e 45°C) on enzymatic formation of galactooligosaccharides from lactose. A decrease of enzyme concentration and

temperature and an increase of pH value resulted in a higher galactooligosaccharides production. The major product was identified as 4'galactosyl-lactose by high performance liquid chromatography.

1. INTRODUÇÃO

A composição da dieta tem forte influência na fisiologia intestinal e no metabolismo da microflora, sendo os carboidratos dos alimentos determinantes para a composição da flora intestinal (SAKO et al., 1999).

Os carboidratos que participam da dieta podem ser classificados baseados nas propriedades fisiológicas de digeríveis ou não digeríveis, havendo três principais tipos de carboidratos não digeríveis: os polissacarídeos não amídicos, os amidos resistentes e os oligossacarídeos não digeríveis [NDOs – non-digestible oligosaccharides] (VORAGEN, 1998), estando neste grupo incluídos os galactooligossacarídeos.

Os galactooligossacarídeos (GOS) apresentam configuração β e as enzimas digestivas gastrointestinais humanas são principalmente específicas para ligações α , sendo então resistentes a digestão e absorção no intestino atingindo o cólon, onde são fermentados, promovendo um aumento das bifidobactérias (SAKO, 1999) e redução das bactérias deterioradoras, consequentemente ocasionando efeitos benéficos para a saúde humana com a redução de metabólitos tóxicos (MODLER, 1994; TOMOMATSU, 1994). Ainda, a ingestão de GOS aumenta a mineralização óssea e a resistência contra fraturas, devido a estimulação da absorção de cálcio (BROUNS e VERMMER, 2000).

A formação de GOS a partir da 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). Quanto maior a concentração de lactose houver no sistema maior será a produção de GOS (LÓPEZ-LEIVA e GUSMAN, 1995; ALBAYRAK e YANG, 2002; ROY et al., 2002). Os GOS são compostos de lactose e unidades de galactose, produzidos comercialmente por reação enzimática onde resíduos de galactose estão ligados à lactose (ZARATÉ e LÓPEZ-LEIVA, 1990).

Para se estudar os efeitos dos fatores por análise univariável, além de necessitar de um grande número de experimentos a avaliação só pode ser feita individualmente, onde um fator é fixado num valor e varia-se o outro até descobrir o valor que produz o maior rendimento, sem se levar em conta que ocorre interação entre as variáveis (BARROS NETO et al., 1995). Utilizando-se da metodologia de superfície de resposta pode-se obter como resultado a interação dos fatores e uma faixa de melhor atuação.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Fonte de enzima

Como fonte de enzima foi utilizado o fungo *Scopulariopsis* sp isolado por PASTORE e PARK (1979) e depositado na American Type Culture Collection (ATCC) sob o número 44206.

2.2 PRODUÇÃO DE β -GALACTOSIDASE

O fungo foi produzido por fermentação semi-sólida, cultivado em meio farelo de trigo e água na proporção de 1:1 (p/v). Em frasco Erlenmeyer de 500 mL, contendo 20g de substrato e esterilizado à 121°C por 20 minutos, foi adicionada uma suspensão de esporos (10^8 esporos/mL). Após incubação à 30°C por 7 dias foi adicionado 100mL de água destilada e o meio triturado com bastão de vidro para liberação da enzima, obtendo-se após filtração o extrato enzimático. A β -galactosidase foi obtida por precipitação com sulfato de amônio a 80% de saturação. O precipitado obtido foi dialisado contra água, centrifugado e liofilizado, sendo armazenado à -18°C.

2.3 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE β -GALACTOSIDASE

A atividade da β -galactosidase (EC 3.2.1.23 β -galactosídeo galactohidrolase) foi determinada usando *o*-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo (ONPG) como substrato. O meio de reação constou de 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, sendo a mistura incubada a 60°C por 15 minutos. A reação foi paralisada com 0,15 mL de

carbonato de sódio a 10%. A absorbância da solução foi medida a 420 nm, contra branco. Uma unidade de atividade de β -galactosidase foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 μ mol de *o*-nitrofenol por minuto em 1 mL, nas condições de ensaio.

2.4 SÍNTESE DE GALACTOOLIGOSSACARÍDEOS

O sistema de reação para a produção de galactooligossacarídeos consistiu na mistura da enzima β -galactosidase com solução de lactose a 40% (p/v), preparada em tampões com valores de pH preestabelecidos. Foi utilizado um planejamento fatorial completo 2^3 , os níveis de estudo estão apresentados na tabela 5.1. Foram analisadas as variáveis independentes: pH, temperatura e concentração de enzima, e a variável dependente, síntese do galactooligossacarídeo 4'galactosil-lactose. Após 24 horas o experimento foi interrompido pela inativação da enzima em banho fervente por 10 minutos e os produtos foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), utilizando um cromatógrafo líquido Waters e coluna Supelcogel™ Ca (300x7,8mm), sendo usado água como solvente e um fluxo de 0,5 mL/min a 80°C. 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 (trissacarídeo). Foram realizados 17 ensaios, com 3 pontos centrais e 4 pontos axiais. A análise estatística dos resultados foi realizada através do software STATISTICA utilizando Experimental design.

Tabela 5.1 – Fatores e níveis estudados no planejamento experimental fatorial de 2 níveis para formação de 4'gal-lactose

Fatores	Níveis				
	-1,68	-1	0	+1	+1,68
Enzima (U/mL)	2,64	4	6	8	9,36
pH	4,32	5	6	7	7,68
Temperatura (°C)	31,6	35	40	45	48,4

2.5 Fracionamento dos carboidratos

A mistura de galactooligossacarídeos comercializada atualmente no Japão é formada por várias espécies moleculares de oligossacarídeos, lactose e monossacarídeos (MATSUMOTO et al., 1995). Os diversos estudos realizados atualmente têm por objetivo aumentar a síntese de galactooligossacarídeos e diminuir a lactose e monossacarídeos residuais do produto final (SHIN et al., 1998; CRUZ et al., 1999; PERRIN et al., 2000; HUNG e LEE, 2002; ROY et al., 2002). Uma forma de aumentar a concentração dos galactooligossacarídeos e diminuir os demais açúcares é fracionar a mistura obtendo um produto mais puro.

Para o fracionamento dos carboidratos foi utilizada uma coluna de carvão ativado baseada no método descrito por PUTMAN (1960). A coluna cromatográfica foi preparada com a mistura de carvão ativado de 32-65 mesh e sílica grau cromatográfico de 30-60 mesh na proporção de 1:2, sendo equilibrada com água nano-pura, filtrada em filtro com porosidade de 0,45µm e degaseificada.

A mistura de açúcares aplicada na coluna de carvão ativado foi obtida após 24 horas de reação da β -galactosidase de *Scopulariopsis* sp em solução de lactose 40% (p/v), sendo utilizadas as condições do nível 0 do planejamento experimental (tabela 5.1). Após paralisada a reação o pH foi ajustado para 7,0 e o fracionamento foi realizado por sucessivas eluições com água, etanol 5% e etanol 15%, para separação de monossacarídeos, dissacarídeos e trissacarídeos, respectivamente (PUTMAN, 1960). O fluxo utilizado foi de 3mL/min, sendo coletado 15 mL/tubo, em todas as frações foram determinados os açúcares redutores pelo método de DNS (MILLER, 1959). As frações eluídas com etanol 15% que apresentaram açúcares redutores foram concentradas por liofilização e analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência, sendo as condições da corrida cromatográfica descritas no item 2.4.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Síntese de galactooligossacarídeos

Os resultados da análise correspondentes ao planejamento fatorial de dois níveis são apresentados na tabela 5.2, toda a análise foi realizada com os valores

das variáveis dependentes codificados. A resposta considerada foi a porcentagem de área do galactooligossacarídeo 4'galactosil-lactose (4'gal-lactose). As variáveis pH, temperatura e concentração de enzima e suas interações foram significativas a nível de 10%.

Tabela 5.2 – Matriz dos experimentos para planejamento experimental fatorial de dois níveis e a porcentagem de área de 4'gal-lactose formados

	Enzima	pH	Temperatura	4'gal-lactose (%)
1	-1	-1	-1	20,13
2	+1	-1	-1	18,81
3	-1	+1	-1	20,25
4	+1	+1	-1	20,92
5	-1	-1	+1	18,83
6	+1	-1	+1	16,37
7	-1	+1	+1	20,30
8	+1	+1	+1	19,45
9	-1,68	0	0	20,56
10	+1,68	0	0	18,20
11	0	-1,68	0	17,85
12	0	+1,68	0	21,00
13	0	0	-1,68	20,45
14	0	0	+1,68	17,85
15	0	0	0	19,56
16	0	0	0	19,19
17	0	0	0	19,31

Tabela 5.3 – Efeito da concentração da enzima, pH e temperatura na síntese de galactooligossacarídeos

	Efeitos	Erro puro	t(2)	p
Média	19,374	0,056	340,407	0,000009
(1) Enzima (L)	- 0,990	0,133	-7,416	0,017697
(2) pH (L)	1,695	0,133	12,698	0,006144
(3) Temperatura (L)	-1,290	0,133	- 9,664	0,010538
(1) e (2)	0,900	0,133	6,742	0,021296
(1) e (3)	-0,665	0,133	-4,982	0,038007
(2) e (3)	0,580	0,133	4,345	0,049095

Conforme demonstrado na tabela 5.3, o efeito da concentração de enzima, do nível -1 para +1, foi negativo, indicando que 4U/mL (-1) de enzima apresentou melhor produção de 4'gal-lactose do que 8U/mL (+1), o que pode ser comprovado analisando as figuras 5.2 e 5.3, onde se observa a tendência de se aumentar a síntese de galactooligossacarídeos com a diminuição da concentração de enzima.

O efeito do pH, quando houve aumento do nível -1 para +1, foi positivo, assim na faixa estudada o valor de pH 7,0 foi melhor para a síntese do galactooligossacarídeos que o valor de pH 5,0, havendo uma tendência de se trabalhar com valores de pH menos ácidos (figuras 5.1 e 5.3).

Quando analisada a variação da temperatura o efeito foi negativo indicando que a temperatura no nível mais baixo (35°C) foi mais adequada para o sistema, e em temperaturas mais altas a tendência é diminuir a produção de 4'gal-lactose (figuras 5.1 e 5.2).

O modelo matemático obtido através da análise estatística é apresentado na equação abaixo com $R^2 = 0,9838$, onde x_1 = enzima, x_2 = pH e x_3 = temperatura:

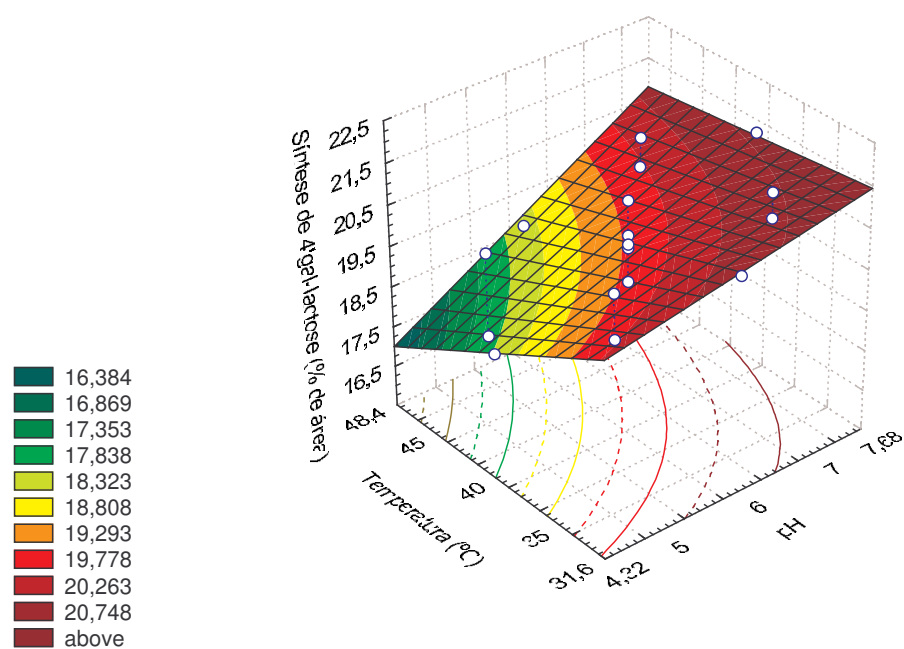
$$\text{Produção de 4'gal-lactose} = 19,354 - 0,580x_1 + 0,884x_2 - 0,698x_3 + 0,45x_1x_2 - 0,332x_1x_3 + 0,29x_2x_3$$

Tabela 5.4 - Análise de variância (ANOVA) para formação de 4'gal-lactose

	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	Fcal	Ftab	Fcal/Ftab
Regressão	25,115	6	4,185	101,33	2,46	41,19
Resíduo	0,413	10	0,0413			
Falta de ajuste	0,343	8				
Erro puro	0,071	2				
Total	25,528	16				

Conforme a tabela 5.4, a análise de variância demonstra que o modelo é preditivo e estatisticamente significativo com a relação Fcal/Ftab de 41,19; $p < 0,1$.

(a)



(b)

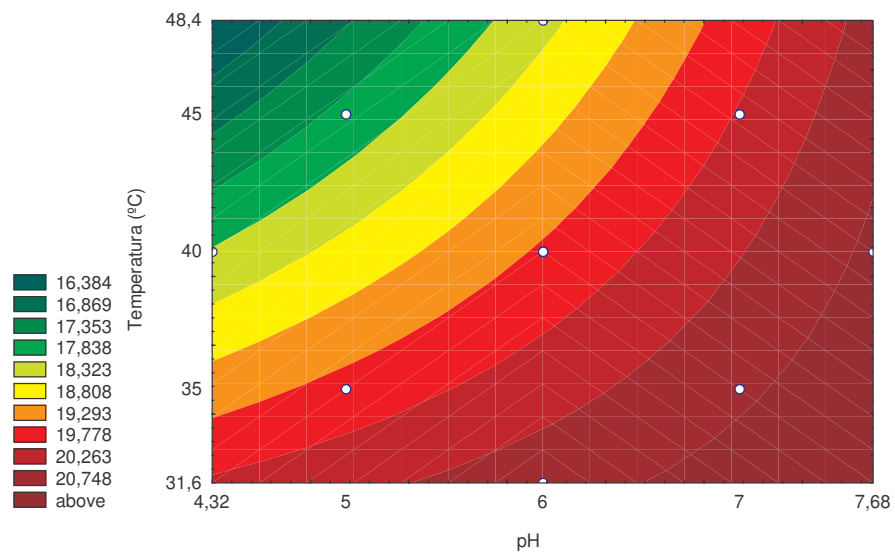


Figura 5.1 - Efeito do pH e da temperatura na produção de 4'galactosil-lactose a partir de lactose 40% (p/v), utilizando 6U/mL de β -galactosidase. (a) superfície de resposta , (b) área de contorno

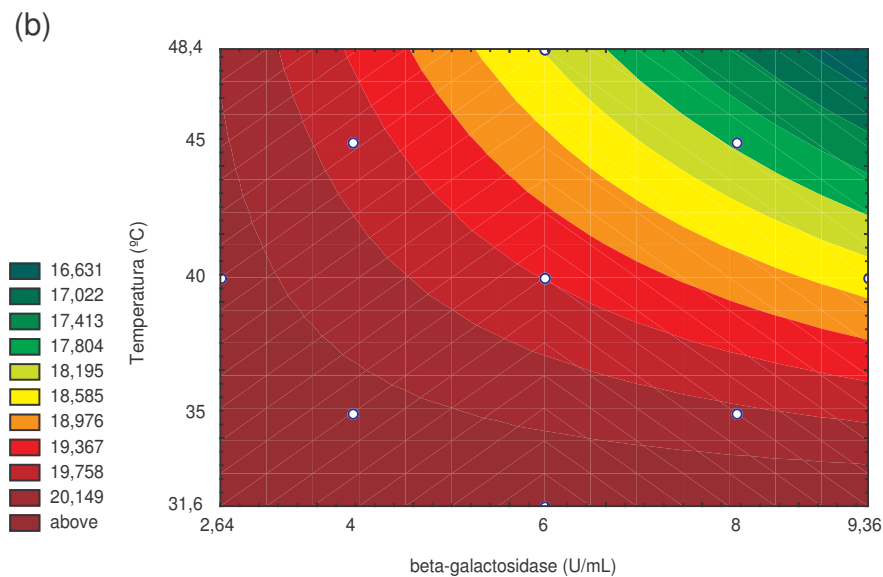
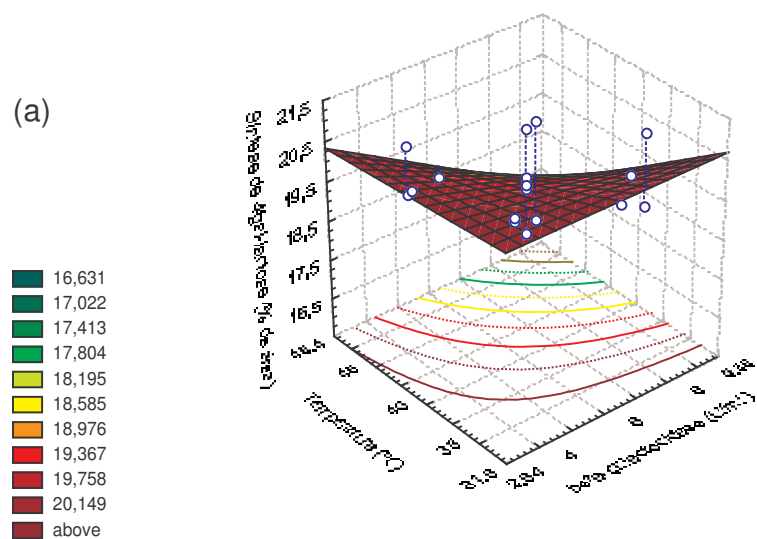


Figura 5.2 – Efeito da temperatura e da concentração de β -galactosidase na produção de 4'-galactosil-lactose a partir de lactose 40% (p/v) em pH 6,0. (a) superfície de resposta, (b) área de contorno

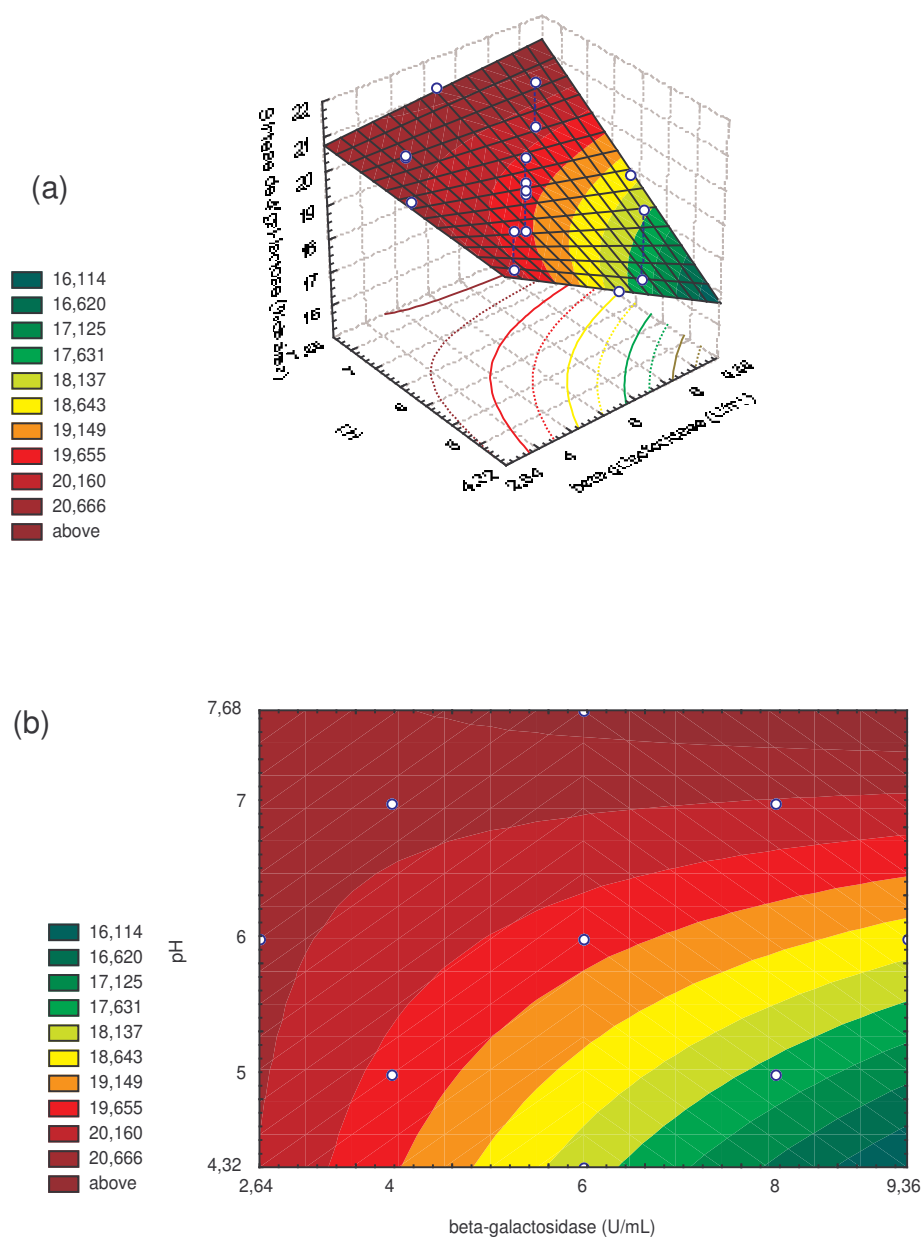


Figura 5.3 - Efeito do pH e da concentração de β -galactosidase na produção de 4'galactosil-lactose a partir de lactose 40% (p/v) à 40°C. (a) superfície de resposta, (b) área de contorno

De um modo geral, analisando todo o experimento, observa-se que não há grandes variações nas respostas encontradas nos ensaios. Poderia se ampliar os valores das variáveis dependentes para se obter maiores diferenças e então conseguir uma região de máxima resposta.

Por outro lado as condições estudadas para produção de GOS se mostram bastante interessantes, pelo perfil cromatográfico das amostras obtidas do planejamento experimental pode-se observar que vários galactooligossacarídeos são sintetizados, provavelmente tetrassacarídeos e açúcares maiores, apesar de só ter sido possível identificar o trissacarídeo 4'gal-lactose. Para exemplificar, está apresentado na figura 5.4 o cromatograma obtido da análise por CLAE do ensaio 12 da tabela 5.2, onde os galactooligossacarídeos foram sintetizados em pH 7,68 à 40°C utilizando 6U/mL de β -galactosidase de *Scopulariopsis* sp.

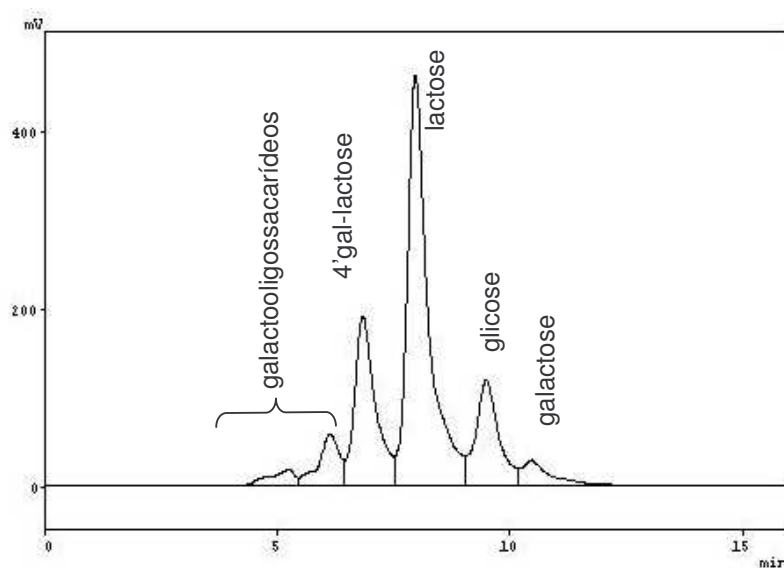


Figura 5.4 – Perfil cromatográfico de carboidratos em coluna Supelcogel™ Ca, após 24 horas de reação a partir de solução de lactose 40% (p/v) em pH 7,68 à 40°C, utilizando 6U/mL de β -galactosidase de *Scopulariopsis* sp

Apesar de não haver grandes variações nas respostas do planejamento em relação a síntese de 4'galactosil-lactose, o ensaio 12 da tabela 5.2 apresentou maior produção de GOS, sendo obtido 21% de 4'gal-lactose que equivale a 84 mg/mL.

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

ROY e colaboradores (2002) estudaram a otimização de GOS com β -galactosidase de *Bifidobacterium infantis* utilizando a metodologia de superfície de resposta, as variáveis independentes foram: concentração de células, concentração de lactose, tempo de reação e temperatura; os valores ótimos encontrados estavam próximos a área associada com 40% (p/v) de lactose, 2.10^9 ufc/mL, 50°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 tendência de que quanto maior concentração de lactose no meio mais GOS serão sintetizados (BURVALL et al., 1979; LÓPEZ-LEIVA e GUSMAN, 1995; ALBAYRAK e YANG, 2002).

3.2 Fracionamento dos carboidratos

A amostra utilizada para o fracionamento dos carboidratos, antes de ser aplicada na coluna de carvão ativado, foi analisada por CLAE e o perfil cromatográfico obtido está apresentado na figura 5.5. Nesta amostra foram identificados os carboidratos galactose, glicose, lactose e 4'galactosil-lactose. Como a coluna cromatográfica (Supelcogel™ Ca) utilizada na CLAE separa os composto pelo peso molecular, os demais carboidratos encontrados e não identificados também foram considerados galactooligossacarídeos, por terem sido eluídos após o trissacarídeo 4'galactosil-lactose, indicando serem de maior peso molecular (figura 5.5).

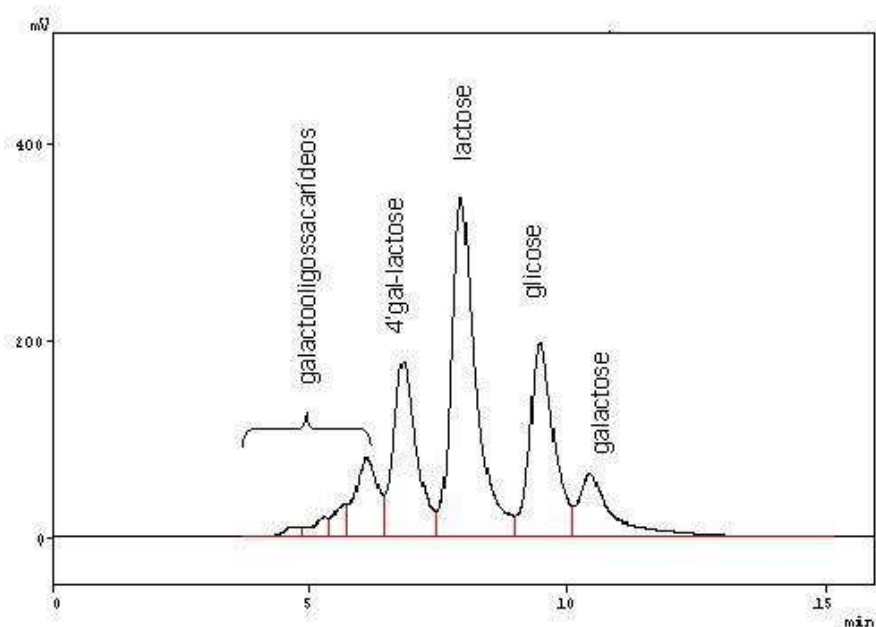


Figura 5.5 – Perfil cromatográfico de carboidratos coluna Supelcogel™ Ca, após 24 horas de reação a partir de solução de lactose 40% (p/v) em pH 6,0 à 40°C, utilizando 6 U/mL de *β*-galactosidase de *Scopulariopsis* sp

A solução de açúcares aplicada na coluna de carvão ativado e sílica para fracionamento dos carboidratos apresentou uma mistura de galactooligosacarídeos, lactose, glicose e galactose (figura 5.5), sendo 19% desta solução o trissacarídeo 4'galactosil-lactose e 37% a lactose (porcentagem de área).

Na coluna de carvão ativado, onde foi realizada a separação dos carboidratos da mistura, os açúcares em solução aquosa são adsorvidos cromatograficamente no carvão e desorvidos seletivamente com soluções de etanol (PUTMAN, 1960).

O perfil cromatográfico do fracionamento dos açúcares eluídos com etanol 15% está apresentado na figura 5.6. Foram encontrados açúcares redutores nas frações 81 a 87 e 97 a 101 que foram unidas e denominadas de fração A e B, respectivamente. Segundo PUTMAN (1960) os monossacarídeos são eluídos com água, os dissacarídeos, que neste caso seria em maior quantidade a lactose, com etanol 5% e os trissacarídeos com etanol 15%.

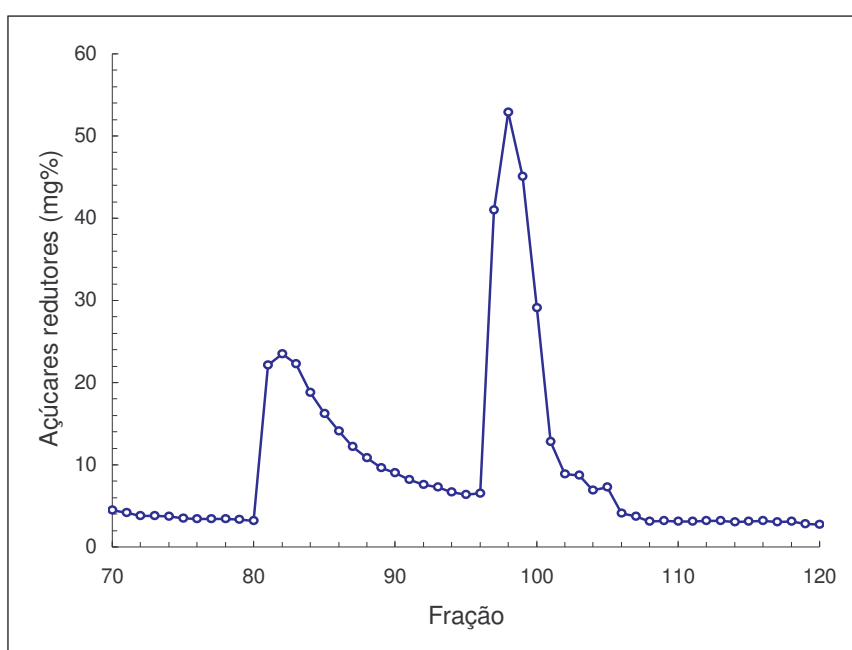


Figura 5.6 – Perfil cromatográfico da amostra obtida do fracionamento dos açúcares em coluna de carvão ativado:sílica eluídos com etanol 15%

As frações A e B eluídas da coluna de carvão ativado:sílica foram analisadas por CLAE. A fração A apresentou dois picos, sendo um identificado como lactose e o outro possivelmente seja um galactooligossacarídeo, pois apresentou tempo de retenção maior que o trissacarídeos 4'galactosil-lactose. Na fração B também foram detectados dois picos e identificados como lactose e 4'galactosil-lactose com áreas de 41% e 59%, respectivamente.

Os resultados obtidos indicam que houve o fracionamento de carboidratos, pois os monossacarídeos e parte da lactose residual foram separados da amostra, provavelmente eluídos com água e etanol 5%, respectivamente. Porém não se obteve frações com apenas uma espécie molecular.

A coluna de carvão ativado:sílica foi capaz de fracionar parcialmente os açúcares da mistura, sendo eluídas uma frações com uma mistura de lactose e galactooligossacarídeos. Possivelmente possa se conseguir melhores resultados com mudanças na condições da corrida cromatográfica, como fluxo e concentração de etanol. O processo empregado mostrou-se promissor para obter uma solução de açúcares com maior teor de GOS e futuramente se produzir um xarope de galactooligossacarídeos.

A reação de transgalactosilação, com a formação de galactooligossacarídeos, ocorre pela transferência do resíduo de açúcar que forma a parte glicona da molécula do substrato para outra molécula de açúcar, quando a transferência é feita para a água a reação é de hidrólise (WALLENFELS e MALHOTRA, 1961). Também pode ser considerada a reação de transferência como competição entre a água e moléculas de açúcar pelo complexo enzima-substrato, devido a isto é que com o aumento da concentração de lactose aumenta a quantidade de oligossacarídeos (TOBA e ADACHI, 1978).

O número de oligossacarídeos formados a partir da lactose via reação de transferência varia de três a onze (PAZUR, 1953), o tipo de galactooligossacarídeo formado é dependente do microrganismo, das condições de cultivo e do sistema empregado.

O trissacarídeo 4'galactosil-lactose foi preferencialmente formado pela β -galactosidase de *Sporobolomyces singularis* (GORIN et al., 1964) e *Sterigmatomyces elviae* (ONISHI et al., 1995). Outros trissacarídeos como 6'galactosil-lactose foram sintetizados por β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* (TOBA et al., 1985) e *Trichoderma harzianum* (PRAKASH et al., 1987), e 3'galactosyl-lactose pela β -galactosidase de *Streptococcus thermophilus* (PERRIN et al., 2000). 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 ocorre 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 (TANAKA et al., 1983; OHTSUOKA et al., 1989).

4. CONCLUSÕES

A enzima β -galactosidase de *Scopulariopsis* sp apresentou alta atividade de transgalactosilação sintetizando galactooligossacarídeos.

As condições experimentais foram efetivas para a produção dos oligossacarídeos.

Para a produção de galactooligossacarídeos por planejamento experimental as variáveis estudadas e suas interações foram significativas a nível de 10%. O efeito da temperatura e da concentração de enzima, quando houve aumento do nível -1 para -1, foi negativo e do pH, positivo, mostrando a tendência de se diminuir os valores das duas primeiras variáveis e aumentar o da terceira, para elevar a síntese do trissacarídeo 4'gal-lactose e consequentemente de outros galactooligossacarídeos.

Não houve grandes variações nas respostas obtidas no planejamento experimental em relação a síntese de 4'galactosil-lactose. Porém, após 24 horas

de reação em pH 7,68 à 40°C, utilizando 6U/mL de β -galactosidase de *Scopulariopsis* sp houve a maior produção de GOS, sendo obtido 21% de 4'galactose que equivale a 84 mg/mL

A análise de variância demonstrou que o modelo é preditivo e estatisticamente significativo com a relação F_{cal}/F_{tab} de 41,29; $p < 0,1$.

A coluna de carvão ativado foi capaz de fracionar parcialmente os açúcares da amostra, sendo eluídas frações com uma mistura de lactose e galactooligossacarídeos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS R. E. **Planejamento e otimização de experimentos**. 2 ed. Campinas, SP: Editora da Unicamp, 1995, 299p.

BERGER, J.L.; LEE, B.H.; LACROIX, C. Oligosaccharides synthesis by free and immobilized β -galactosidases from *Thermus aquaticus* YT-1. **Biotechnmology Letters**. v.17, n. 10, p.1077-1080, 1995.

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. 4, p. 243-250, 1979.

CRUZ, R.; CRUZ, V.D.; BELOTE, J.G.; KHENAYFES, M.O. DORTA, C.; OLIVEIRA, L.H.S.; ARDILES, E.; GALLI, A. Production of transgalactosylated oligosaccharides (TOS) by galactosyltransferase activity from *Penicillium simplicissimum*. **Bioresource Technology**. v. 70, p. 165-171, 1999.

GORIN, P. A.J.; SPENCER, J.F.T.; PHAFF, H.J. The structures of galactosyl-lactose and galactobiosyl-lactose produced from lactose by *Sporobolomyces singularis*. **Canadian Journal of Chemistry**. v. 42, 1964.

HUNG M. N.; LEE, B. H. Purification and characterization of a recombinant with transgalactosylation activity from *Bifidobacterium infantis* HL96. **Applied Microbiology Biotechnology**. v. 58, n. 4, p. 439-45, 2002.

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.

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

MATSUMOTO, K. KOBAYASHI, Y.;UEYAMA, S.; WATANABE, T. TANAKA, R. KAN, T. KUROBA, A.; SUMIHARA, Y. (1990). Galactooligosaccharides. In: NAKANUKI, T (Ed.). Oligosaccharides: production, properties and applications. Shizuoka: Gordon and Breach Science, 1995, p. 90-106 (Japanese Technology Reviews).

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. **Analytical Chemistry**. v. 31, p. 426-428, 1959.

MODLER, H.W. Bifidogenic factors – Sources, metabolism and applications. **International Dairy Journal**. v. 4, p. 383-407, 1994.

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

ONISHI, N.; TANAKA, T. Purification and properties of a novel thermostable galacto-oligosaccharide producing β -galactosidases from *Sterigmatomyces elviae* CBS8119. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 61, n.11, p.4026-4030, 1995.

ONISHI, N.; TANAKA, T. Purification and characterization of galacto-oligosaccharide-producing β -galactosidase from *Sirobasidium magnum*. **Letters in Applied Microbiology**. v. 24, p. 82-86, 1997.

PASTORE, G.M.; PARK, Y.K. Screening of high β -galactosidase-producing fungi and characterizing the hydrolysis properties of a selected strain. **Journal of Food Science**. v. 44, p. 1577-1579, 1979.

PAZUR, J. H. The enzymatic conversion of lactose into galactosyl oligosaccharides. **Science**., v. 177, p. 355, 1953.

PERRIN, V.; FENET, B.; PRALY, J.; LECROIX, F.; DUNG TA, C. Identification and synthesis of trisaccharides produced from lactose by transgalactosylation. **Carbohydrate Research**. v. 325, p. 202-210, 2000.

PRAKASH, S.; SUYAMA, K; ITOH. T. ADACHI. S. Oligosaccharide formation by *Trichoderma harzianum* in lactose containing medium. **Biotechnology Letters**. v. 9, n.4, p.249-252, 1987.

PRAKASH, S.; SUYAMA, K; ITOH. T. ADACHI. S. Structure elucidation of major galacto oligosaccharides formed by growing culture of *Trichoderma harzianum*. **Journal Agriculture Food Chemistry**. v. 37, p.334-337, 1989.

PUTMAN, E. W. Column Chromatography of Sugars. In: **Methods in Enzymology**. Preparation and assay of substrates. Colowick, 1960. v. 3, p. 57-61.

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.

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 of non-digestible galacto-oligosaccharides. **International Dairy Journal**. v.9, p.69-80, 1999.

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.

TANAKA, R.; TAKAYAMA, H.; MOROTOMI, M.; KUROSHIMA, T.; UEYAMA, S.; MATSUMOTO, K.; KURODA, A.; MUTAI, M. Effects of administration of TOS and *Bifidobacterium breve* 4006 on the human fecal flora. **Bifidobacteria Microflora**. v. 2, n. 1, p. 17-24, 1983.

TOBA, T.; ADACHI, S. Hydrolysis of lactose by microbial β -galactosidase. Formation of oligosaccharides with special reference to 2-O- β -D- galactopyranosyl-D-glucose. **Journal of Dairy Science**. v. 61, n.1, 1978.

TOBA, T.; YOKOTA, A. E ADACHI, S. Oligosaccharide structures formed during the hydrolysis of lactose by *Aspergillus oryzae* β -galactosidase. **Food Chemistry**. v. 16, p. 147-162, 1985.

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

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

WALLENFELS, K.; MALHOTRA, O. P. Galactosidase. **Advances Carbohydrate Chemistry**. v. 16, p. 239-298, 1961.

ZARATÉ S.; LÓPEZ-LEIVA, M. H. Oligosaccharide formation during enzymatic lactose hydrolysis: a literature review. *J. Food Prot.* v. 53, p. 262-268, 1990.

CONCLUSÕES FINAIS

O microrganismo *Scopulariopsis* sp produziu a enzima β -galactosidase por fermentação semi-sólida, em meio farelo de trigo e água (1:1) e foi sintetizada sem necessidade de indutor, demonstrando ser constitutiva.

O extrato enzimático manteve maior atividade quando o fracionamento das proteínas foi feito com sulfato de amônio a 80% de saturação.

A β -galactosidase do extrato bruto apresentou atividade ótima em pH 4,5 e à 65°C nos substratos lactose e ONPG. A enzima apresentou maior estabilidade em pH 5,0 e mostrou-se estável após 3 horas de tratamento térmico à 50°C.

A β -galactosidase foi purificada cerca de 13 vezes a partir do extrato bruto, através de fracionamento com sulfato de amônio, cromatografia de troca iônica e filtração em gel, com um rendimento de 14%. A enzima apresentou característica aniônica, porém não se apresentou na forma pura. O seu peso molecular estimado por filtração em gel foi de 98,38 KDa.

A β -galactosidase de *Scopulariopsis* sp parcialmente purificada apresentou atividade ótima em torno de pH 4,5 e 60°C. A enzima mostrou maior estabilidade em pH 5,0, mantendo-se estável em temperaturas próximas à 40°C após 24 horas.

A enzima apresentou comportamento cinético de Michaelis-Menten, com Km de 2,28 mM e Vmax de 123 μ moles/mL/min para o substrato ONPG.

Os íons Fe^{+2} , Fe^{+3} e Mn^{+2} ativaram a β -galactosidase de *Scopulariopsis* sp, sugerindo que possam fazer parte do seu sítio ativo. E a enzima foi totalmente inativada em presença de N-bromosuccinimida na concentração de 0,1 mM.

A β -galactosidase de *Scopulariopsis* sp apresentou atividade de transgalactosilação, sintetizando em maior quantidade o trissacarídeo 4'galactosil-lactose.

Quando estudada a produção de GOS por análise univariável o pH do sistema não teve influência na conversão da lactose em galactooligossacarídeos. Temperaturas mais elevadas aceleraram a síntese de GOS nas primeiras horas, sendo obtido à 45°C com 6 horas de reação um rendimento próximo ao máximo, encontrado à 35°C em 24 horas de reação. A maior produção de GOS ocorreu entre 9 e 12 horas de reação com uma conversão de 22% da lactose em galactooligossacarídeos.

No estudo da produção de galactooligossacarídeos por planejamento experimental não houve grandes variações nas respostas obtidas em relação a síntese de 4'galactosil-lactose. Porém, a maior resposta encontrada foi após 24 horas de reação em pH 7,68 à 40°C, utilizando 6U/mL de β -galactosidase de *Scopulariopsis* sp quando foi obtido 21% de 4'gal-lactose que equivale a 84 mg/mL.

A coluna de carvão ativado foi capaz de fracionar parcialmente os açúcares da amostra, sendo eluídas frações com uma mistura de lactose e galactooligossacarídeos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.

BALLIO, A.; RUSSI, S. Chromatographic fractionation and chemical characterization of some oligosaccharides synthesized from lactose by *Penicillium chrysogenum* thom. **Journal Chromatography**. v. 4, p.117-129, 1960.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS R. E. **Planejamento e otimização de experimentos**. 2 ed. Campinas, SP: Editora da Unicamp, 1995, 299p.

BATRA, N.; SINGH, J.; BANERJEE, U. C.; PATNAIK, P. R.; SOBTI, R. C. Production and characterization of a thermostable β -galactosidase from *Bacillus coagulans* RCS3. **Biotechnology Applied Biochemistry**. v. 36, part1, p. 1-6, 2002.

BERGER, J.L.; LEE,B.H.; LACROIX, C. Oligosaccharides synthesis by free and immobilized β -galactosidases from *Thermus aquaticus* YT-1. **Biotechnmology Letters**. v.17, n. 10, p.1077-1080, 1995a.

BERGER, J.L.; LEE,B.H.; LACROIX, C. Immobilization of β -galactosidase from *Thermus aquaticus* YT-1 for oligosaccharides synthesis. **Biotechnology Techniques**. v. 9, n. 8, p. 601-601, 1995b.

BERGER, J.L.; LEE,B.H.; LACROIX, C. Purification, properties and characterization of a high-molecular-mass β -galactosidase isoenzyme from *Thermus aquaticus* YT-1. **Biotechnology Applied and Biochemistry**. v.25, p.29-41, 1997.

BOON, M.A.; JANSSEN, A.E.M.; VAN'T RIET, K. Effect of temperature and enzyme origin on the enzymatic synthesis of oligosaccharides. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 26, p.271-281, 2000.

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. 4, p. 243-250, 1979.

CAVAILLE, D.; COMBES, D. Characterization of beta-galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. **Biotechnology and Applied Biochemistry**. v. 22, n.1, p. 55-64, 1995.

CHONAN, O.; WATANUKI, M. Effect of galactooligosaccharides on calcium absorption in rats. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**. v.41, p.95-104, 1995.

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

CRUZ, R.; CRUZ, V.D.; BELOTE, J.G.; KHENAYFES, M.O. DORTA, C.; OLIVEIRA, L.H.S.; ARDILES, E.; GALLI, A. Production of transgalactosylated oligosaccharides (TOS) by galactosyltransferase activity from *Penicillium simplicissimum*. **Bioresource Technology**. v. 70, p. 165-171, 1999.

DAHLQVIST, A. Determination of maltase and isomaltase activities with a glucose-oxidase reagent. **Biochemistry Journal**. v. 80, p.547-551, 1961.

DUMORTIER, V.; BRASSART, C. BOUQUELET, S. Purification and properties of a β -D-galactosidase from *Bifidobacterium bifidum* exhibiting a transgalactosylation reaction. **Biotechnology Applied Biochemistry**. v. 19, p. 341-354, 1994.

EKHART, P. F.; TIMMERMANS, E. Techniques for the production of transgalactosylated oligosaccharides (TOS). **Bulletin of IDF** 313.n. 313, p. 59-64, 1996.

FERNANDES, S.; GEUEKE, B.; DELGADO, O.; COLEMAN, J.; HATTI-KAUL, R. β -galactosidase from a cold-adapted bacterium: purification, characterization and application for lactose hydrolysis. **Applied Microbiology Biotechnology**. v. 58, n. 3, p. 313-21, 2002.

GORIN, P. A.J.; SPENCER, J.F.T.; PHAFF, H.J. The structures of galactosyl-lactose and galactobiosyl-lactose produced from lactose by *Sporobolomyces singularis*. **Canadian Journal of Chemistry**. v. 42, 1964.

GREENBER, N.A.; MAHONEY, R.R. Formation of oligosaccharides by β -galactosidase from *Streptococcus thermophilus*. **Food Chemistry**. v.10, p.195-204, 1983.

HUBER, R.E.; KURZ, G.; WALLENFELS, K. A quantitation of the factors which affect the hydrolase and transgalactosylase activities of β -galactosidase (*E. coli*) on lactose. **Biochemistry**. v.15, n.9, 1976.

HUNG M. N.; LEE, B. H. Purification and characterization of a recombinant with transgalactosylation activity from *Bifidobacterium infantis* HL96. **Applied Microbiology Biotechnology**. v. 58, n. 4, p. 439-45, 2002.

ISHIKAWA, F.; TAKAYAMA, H.; MATSUMOTO, K.; ITO, M.; CHONAN, O.; DEGUCHI, Y.; KIKUCHI-HAYAKAWA, H.; WATANUKI, M. Effects of β 1-4 linked galacto-oligosaccharides on human fecal microflora. **Bifidus**. v.9, p. 5-18, 1995.

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.

KIM, J. W.; RAJAGOPAL, S. N. Isolation and characterization of β -galactosidase from *Lactobacillus crispatus*. **Folia Microbiol** (Praha). v. 45, n. 1, p. 29-34, 2000.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**. v. 227, p. 680-685, 1970.

LEE, D. H.; KANG, S. G.; SUH, S. G.; BYUN, J. K. Purification and characterization of a beta-galactosidase from peach (*Prunus persica*). **Mol Cells**. v. 15, n. 1, p. 68-74, 2003.

LINEWEAVER, H.; BURK, D. The determination of enzyme dissociation constants. **Journal American Chemistry**. v. 56, p. 658-666, 1934.

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.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Proteins measurement with the Folin-phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**. v. 193, p. 265-275, 1951.

LUND, B.M.; WYATT, G.M. The nature of reducing compounds formed from sucrose by *Erwinia carotovora* var. *atroseptica*. **Journal of General Microbiology**, v.78, p.331-336, 1973.

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

MATSUMOTO, K. KOBAYASHI, Y.; UEYAMA, S.; WATANABE, T. TANAKA, R. KAN, T. KUROBA, A.; SUMIHARA, Y. (1990). Galactooligosaccharides. In: NAKANUKI, T (Ed.). Oligosaccharides: production, properties and applications. Yverdon: Gordon and Breach Science, 1993, p. 90-106 (Japanese Technology Reviews).

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. **Analytical Chemistry**. v. 31, p. 426-428, 1959.

MILLER-CATCHPOLE, R. Bifidobacteria in clinical microbiology and medicine. **Biochemistry and Physiology of Bifidobacteria**, eds A. Bezkorovainy & Miller-Catchpole. CRC Press, Boca Raton, FL, USA, 1989.

MITSUOKA, T. Bifidobacteria and their role in human health. **Journal of Industrial Microbiology**. v. 6, p. 263-268, 1990.

MODLER, H.W. Bifidogenic factors – Sources, metabolism and applications. **International Dairy Journal**. v. 4, p. 383-407, 1994.

MODLER, H.W.; McKELLAR, R.C.; YAGUCHI, M. Bifidobacteria and bifidogenic factors. **Canadian Inst. Food Science. Technology. J.** v. 23, n. 1, p. 29-41, 1990.

MORAES, R. O. **Estudo da produção de beta-galactosidase por fermentação em substrato sólido em colunas de Raimbault.** Campinas, 1999. 105p. Dissertação de mestrado, Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas.

NAGY, Z.; KISS, T.; SZENTIRMAI, A.; BIRO, S. β -galactosidase of *Penicillium chrysogenum*: production, purification and characterization of the enzyme. **Protein Expr Purif.** v. 21, n. 1, p. 24-9, 2001.

NAKANO, H. **Recente japanese development in the enzymatic production and application of oligosaccharides;** apresentado no Seminar on enzyme and bacterial technology, 1998, Campinas. Japan International Cooperation Agency, [s.d.].

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.

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

ONISHI, N.; KIRA, I.; YOKOZEKI, K. Galacto-oligosaccharide production from lactose by *Sirobasidium magnum* CBS6803. **Letters in Applied Microbiology.** v. 23, p. 253-256, 1996.

ONISHI, N.; TANAKA, T. Purification and properties of a novel thermostable galacto-oligosaccharide producing β -galactosidases from *Sterigmatomyces elviae* CBS8119. **Applied and Environmental Microbiology.** v. 61, n.11, p.4026-4030, 1995.

ONISHI, N.; TANAKA, T. Purification and characterization of galacto-oligosaccharide-producing β -galactosidase from *Sirobasidium magnum*. **Letters in Applied Microbiology**. v. 24, p. 82-86, 1997.

ONISHI, N.; YAMASHIRO, A.; YOKOZEKI, K. Production of galacto-oligosaccharide from lactose by *Sterigmatomyces elviae* CBS8119. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 61, n.11, p.4022-4025, 1995.

PARK, Y.K.; PASTORE, G.M. Immobilization of *Scopulariopsis* β -galactosidase to DEAE-cellulose with glutaraldehyde and some properties of the preparation obtained. . **Journal of Fermentation Technology**. v.59, n.2, p.165-168, 1981.

PARK, Y.K.; de SANTI, M.S.S.; PASTORE, G.M. Production and characterization of β -galactosidase from *Aspergillus oryzae*. **Journal of Food Science**. v.44, n.1, p.100-103, 1979.

PASTORE, G.M. PARK, Y.K. Purification and characterization of β -galactosidase from *Scopulariopsis* sp. **Journal of Fermentation Technology**. v.58, n.1, p.79-81, 1980.

PASTORE, G.M.; PARK, Y.K. Screening of high β -galactosidase-producing fungi and characterizing the hidrolisis properties of a selected strain. **Journal of Food Science**. v. 44, p. 1577-1579, 1979.

PAZUR, J. H. The enzymatic conversion of lactose into galactosyl oligosaccharides. **Science**., v. 177, p. 355, 1953.

PEREIRA, J. A. M.; ROSA, P. D. V. E.; PASTORE, G. M.; SANTANA, C. C. Expanded-bed adsorption utilizing ion-exchange resin to purif extracellular beta-

galactosidase. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v. 70-2, p. 779-787, 1998.

PEREIRA, J. A. M. **Adsorção de beta-galactosidase de *Scopulariopsis* sp em resina trocadora de íons objetivando a purificação e a ampliação de escala**. Campinas, 1999. 138p. Tese de doutorado, Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas.

PERRIN, V.; FENET, B.; PRALY, J.; LECROIX, F.; DUNG TA, C. Identification and synthesis of a trisaccharides produced from lactose by transgalactosylation. **Carbohydrate Research**. v. 325, p. 202-210, 2000.

POMERANZ, Y. Lactase (β -galactosidase). I – Occurence and properties. **Food Technology**, v.88, p.682, 1964.

PRAKASH, S.; SUYAMA, K; ITOH. T. ADACHI. S. Oligosaccharide formation by *Trichoderma harzianum* in lactose containig medium. **Biotechnology Letters**. v. 9, n.4, p.249-252, 1987.

PRAKASH, S.; SUYAMA, K; ITOH. T. ADACHI. S. Structure elucidation of major galacto oligosaccharides formed by growing culture of *Trichoderma harzianum*. **Journal Agriculture Food Chemistry**. v. 37, p.334-337, 1989.

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

PUTMAN, E. W. Column Chromatography of Sugars. In: **Methods in Enzymology**. Preparation and assay of substrates. Colowick, 1960. v. 3, p. 57-61.

RASIC, J.L.; KURMANN, J. A. Bifidobacteria and their role. Birkhäuser Verlag, Boston, MA, USA, 1983. In: MODLER, H. W. Bifidogenic factors – Sources, metabolism and applications. **International Dairy Journal**. v. 4, p. 383-407, 1994.

RICHMOND, M.L.; STINE, C.M. β -galactosidase: review of recent research related to technological applications, nutritional concerns, and immobilization. **Journal of Dairy Science**. v. 64, n. 9, p. 1579-1771, 1981.

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.

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 of non-digestible galacto-oligosaccharides. **International Dairy Journal**. v.9, p.69-80, 1999.

SCHWIMMER, S.; BEVENUE, A. Reagent for differentiation of 1,4- and 1,6- linked glucosaccharides. **Science**. v. 123, p. 543-544, 1956.

SHAIKH, S. A.; KHIRE, J. M.; KHAN, M.I. Characterization of a thermostable extracellular β -galactosidase from a thermophilic fungus *Rhizomucor* sp. **Biochimical Biophysica Acta**. v. 1472 n.1-2, p. 314-22, 1999.

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.

SHIN, H.; YANG, J. Galacto-oligosaccharide production by β -galactosidase in hydrophobic organic media. **Biotchnology Letters**. V. 16, n.11, p.1157-1162, 1994.

TAKANO, K.; MIWA, T. J. Biochem. v. 40, p.471, 1953. In WALLENFELS, K.; MALHOTRA, O. P. Galactosidase. **Advances Carbohydrate Chemistry**. v. 16, p. 239-298, 1961.

TAMAI, S.; OHTSUKA, K.; OZAWA, O. UCHIDA, T. Effects of a small amounts of galactooligosaccharides on fecal *Bifidobacterium*. **Journal of the Japanese Society of Nutrition and Food Science**. v.45, p. 456-460, 1992.

TANAKA, R.; TAKAYAMA, H.; MOROTOMI, M.; KUROSHIMA, T.; UYEYAMA, S.; MATSUMOTO, K.; KURODA, A.; MUTAI, M. Effects of administration of TOS and *Bifidobacterium breve* 4006 on the human fecal flora. **Bifidobacteria Microflora**. v. 2, n. 1, p. 17-24, 1983.

TEURI, U.; KORPELA, R.; SAXELIN, M.; MONTONEN, L.; SALMINEN, S. Increased fecal frequency and gastrointestinal symptoms following ingestion of galacto-oligosaccharide-containing yogurt. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**. v.44, p. 465-471, 1998.

TOBA, T.; ADACHI, S. Hydrolysis of lactose by microbial β -galactosidase. Formation of oligosaccharides with special reference to 2-O- β -D- galactopyranosyl-D-glucose. **Journal of Dairy Science**. v. 61, n.1, 1978.

TOBA, T.; YOKOTA, A.; ADACHI, S. Oligosaccharide structures formed during the hidrolisis of lactose by *Aspergillus oryzae* β -galactosidase. **Food Chemistry**. v. 16, p. 147-162, 1985.

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

VAN LAERE, K. M.; ABEE, T.; SCHOLS H.A.; BELDMAN, G.; VORAGEN A. G. Characterization of a novel β -galactosidase from *Bidobacterium adolescentis* DSM 20083 active towards transgalactooligosaccharides. **Applied Environmental Microbiology**. v. 66, n. 4, p. 1379-84, 2000.

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

WALLENFELS, K.; MALHOTRA, O. P. Galactosidase. **Advances Carbohydrate Chemistry**. v. 16, p. 239-298, 1961.

WHITAKER, J.R. **Principles of Enzymology for the Food Sciences**. 2^a ed. São Paulo: Dental Médica Editora e Livraria, 1994, 624p.

ZARATÉ S.; LÓPEZ-LEIVA, M. H. Oligosaccharide formation during enzymatic lactose hydrolysis: a literature review. *J. Food Prot.* v. 53, p. 262-268, 1990.

Nome do arquivo: Mareci Mendes Almeida.doc
Pasta: D:\TESES DIGITAIS\TDE2003
Modelo: C:\Documents and Settings\pesquisa\Dados de aplicativos\Microsoft\Modelos\Normal.dot
Título: UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Assunto:
Autor: Mareci
Palavras-chave:
Comentários:
Data de criação: 28/4/2005 12:00
Número de alterações: 10
Última gravação: 13/9/2005 11:10
Gravado por: FEA
Tempo total de edição: 47 Minutos
Última impressão: 13/9/2005 11:25
Como a última impressão
Número de páginas: 181
Número de palavras: 26.960 (aprox.)
Número de caracteres: 153.677 (aprox.)