



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO



DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DOMÉSTICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DOS
ALIMENTOS

**EFICIÊNCIA DA CONVERSÃO DE LACTOSE EM GALACTO-
OLIGOSSACARÍDEOS (GOS) POR VIA ENZIMÁTICA EM LEITE UHT
DESNATADO**

PRISCILA BARBOSA BEZERRA NUNES

Recife/PE

2017



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DOMÉSTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DOS
ALIMENTOS



PRISCILA BARBOSA BEZERRA NUNES

**EFICIÊNCIA DA CONVERSÃO DE LACTOSE EM GALACTO-
OLIGOSSACARÍDEOS (GOS) POR VIA ENZIMÁTICA EM LEITE UHT
DESNATADO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito para obtenção do Grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

ORIENTADORA: Prof^ª Dr^ª Erilane de Castro Lima Machado.

CO-ORIENTADORA: Prof^ª Dr^ª Andreлина Maria Pinheiro Santos

CO-ORIENTADORA: Prof^ª Dr^ª Samara Alvachian Cardoso Andrade

Recife/PE

2017

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DOMÉSTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS

**EFICIÊNCIA DA CONVERSÃO DE LACTOSE EM GALACTO-
OLIGOSSACARÍDEOS (GOS) POR VIA ENZIMÁTICA EM LEITE UHT
DESNATADO**

Por Priscila Barbosa Bezerra Nunes

Esta dissertação foi julgada para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos e aprovada em 08/02/2017 pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimento em sua forma final.

Banca Examinadora:

Prof/a Dr/a. Celiane Gomes Maia da Silva
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Prof/a Dr/a. Silvana Magalhães Salgado
Universidade Federal de Pernambuco

Prof/a Dr/a. Ana Lúcia Figueiredo Porto
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Dedico este trabalho a Deus, à minha família, e aos meus amigos pelo imenso apoio em toda a trajetória que percorri até aqui.

AGRADECIMENTOS

Início meus agradecimentos a Deus, por ter me dado saúde, discernimento, força e fé em todos os dias de estudo, trabalho e pesquisa, e por ter permitido que meus conhecimentos ajudassem a desenvolver o trabalho com o suporte da equipe envolvida.

Aos meus queridos pais, irmã, e amigos que dividiram comigo todas as conquistas e as situações difíceis pelas quais vivi durante o período do mestrado, deixo registrada minha eterna gratidão por todo o apoio e incentivo doado.

Agradeço a CAPES pelo apoio financeiro que contribuiu para a manutenção dos estudos em todo esse tempo.

A minha orientadora, prof^a Erilane, meu imenso e humilde agradecimento por ter me instruído, me dado todo apoio, e por ter se envolvido e se dedicado em cada etapa do projeto, desde a indicação do tema até a revisão final deste trabalho.

Às minhas co-orientadoras, prof^a Andreлина (Lia) e prof^a Samara, meus agradecimentos pelos conhecimentos repassados, pelos conselhos, e por terem participado conjuntamente para a concretização deste projeto.

À prof^a Tânia Sarmiento do Departamento de Química (UFRPE), que colaborou para que o projeto pudesse, de fato, ser posto em prática, deixo meus sinceros agradecimentos.

À Dr^a Girliane Regina, agradeço por todo o tempo dedicado a repassar seus conhecimentos e por me auxiliar numa grande e importante etapa do projeto.

À toda a equipe do CENAPESQ (UFRPE), agradeço por todo o suporte para o desenvolvimento do projeto de pesquisa.

À prof^a Ana Maria Souto Maior e a toda sua equipe do Laboratório de Processos Biotecnológicos do Departamento de Antibióticos da UFPE, agradeço pelas portas abertas ao uso das instalações do laboratório, o qual foi fundamental em meio às dificuldades encontradas.

À prof^a Ana Porto e a toda equipe do LabTecBio (UFRPE), venho agradecer por pelo uso do laboratório e por todas as instruções que contribuíram para com este trabalho.

Agradeço, por fim, a todos os membros do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da UFRPE, incluindo todas as professoras (sem exceção), e a técnica de laboratório Jaqueline (Jaque) pela paciência, pelos ensinamentos, e por toda a experiência enriquecedora vivida durante o período de mestrado.

A todos, muito obrigada, e que Deus vos abençoe!

RESUMO

Galacto-oligossacarídeos (GOS) são oligossacarídeos derivados de galactose sintetizados por meio de uma reação de transgalactosilação desencadeada por enzimas β -galactosidases a partir da lactose. GOS são considerados ingredientes alimentícios prebióticos por não serem digeridos no trato gastrointestinal, podendo oferecer benefícios à saúde quando consumidos. O leite, por apresentar um pH favorável à atuação da β -galactosidase derivada de *Kluyveromyces lactis*, pode favorecer a hidrólise da lactose e a síntese de galacto-oligossacarídeos. O objetivo deste trabalho foi investigar a eficiência da conversão da lactose em GOS por via enzimática em leite UHT desnatado para obtenção de uma matéria-prima láctea com presença de GOS e com teor reduzido de lactose. A enzima utilizada foi a β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* (Lactozyme 2600L). Foi proposto um planejamento experimental 2^3 com concentrações de lactose de 5, 7,5 e 10% (p/v), atividade enzimática de 5, 7,5 e 10 U.mL⁻¹, e temperaturas a 30, 35 e 40 °C. A análise de carboidratos (glicose, galactose, lactose, 6'-galactosil-lactose, e 6-galactobiose) foi realizada por CLAE-IR. Todos os ensaios alcançaram uma conversão da lactose acima de 94% já nas 2 primeiras horas de reação, sendo os ensaios com maior atividade enzimática (10 U.mL⁻¹) e menor concentração de lactose (5%, p/v) os que apresentaram as melhores condições para a atividade hidrolítica da enzima. Já os ensaios com maior concentração de lactose (10%, p/v) e menor atividade enzimática (5 U.mL⁻¹) favoreceram a reação de transgalactosilação, alcançando, a 30 °C, em 1,5 horas de processo, uma matéria-prima láctea com 0,96% (p/v) de GOS e com teor reduzido de lactose (0,66%, p/v). As análises estatísticas demonstraram que a concentração inicial da lactose foi o parâmetro que exerceu maior influência na atividade enzimática de hidrólise da lactose e de síntese de GOS, enquanto que a temperatura exerceu menor influência. Por ser viável o controle do processo enzimático, as condições empregadas neste estudo permitiram a obtenção de um produto lácteo com teor reduzido de lactose e com presença de GOS que pode vir a ser utilizado como matéria-prima na fabricação de derivados oferecendo benefícios prebióticos que contribuem para a saúde.

Palavras-chave: β -galactosidase; *Kluyveromyces lactis*; Transgalactosilação; Prebiótico.

ABSTRACT

Galacto-oligosaccharides (GOS) are oligosaccharides derived-galactose synthesized from lactose by transgalactosylation reaction by β -galactosidases enzymes. GOS are considered as prebiotic ingredients for being non-digestible in the gastrointestinal tract, that can offer health benefits when consumed. The milk, because your favorable pH to the activity of β -galactosidase derived from *Kluyveromyces lactis*, can promote the hydrolysis of lactose and the synthesis of galacto-oligosaccharides. The objective of this paper was to investigate the efficiency of the conversion of lactose to GOS by enzymatic reaction in skimmed UHT milk to obtain a milk raw material with presence of GOS and reduced lactose content. The enzyme used was a β -galactosidase of *Kluyveromyces lactis* (Lactozyme 2600L). It was proposed an experimental design 2³ with lactose concentrations of 5, 7.5 and 10% (w/v), enzyme concentration of 5, 7.5 and 10 U.mL⁻¹, and temperatures at 30, 35 and 40 °C. The analysis of carbohydrates (glucose, galactose, lactose, 6'-galactosyl-lactose, and 6-galactobiose) was performed by HPLC-IR. All the tests reached a conversion of lactose above 94% in the 2 hours of reaction. The assays with the highest enzymatic activity (10 U.mL⁻¹) and lower lactose concentration (5%, w/v) presented the best conditions for hydrolytic activity of the enzyme. On the other hand, the tests with higher lactose concentration (10%, w/v) and lower enzymatic activity (5 U.mL⁻¹) favored the transgalactosylation reaction, reaching in the milk, at 30 ° C, 0.96% (w/v) of GOS and a reduced lactose content (0.66%, w/v). Statistical analysis showed that the initial lactose concentration was the parameter that exerted the greatest influence on the enzymatic activity of lactose hydrolysis and GOS synthesis, while the temperature had lower influence. Because the control of the enzymatic process is feasible, the conditions employed in this study allowed to obtain a dairy product with reduced lactose content and with the presence of GOS that can be used as raw material in the manufacture of derivatives offering prebiotic benefits that contribute to health.

Keywords: β -galactosidase; *Kluyveromyces lactis*; Transgalactosylation; Prebiotic.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Estrutura química da lactose.....	17
FIGURA 2 – Diferentes tipos de nutracêuticos bioativos derivados da lactose.....	18
FIGURA 3 – Mecanismo de reação simplificado de β -galactosidase em lactose.....	21
FIGURA 4 – Diferentes estruturas de GOS	24
FIGURA 5 - Mecanismo de reação de síntese de galacto-oligossacarídeo (GOS) de lactose	26

ARTIGO

FIGURA 1 – Superfície de resposta da concentração final da lactose em função das concentrações de enzima e de lactose inicial. A: Conversão em 2 horas; B: Conversão em 4 horas; C: Conversão em 6 horas	49
FIGURA 2 – Superfície de resposta da síntese de GOS total, em 2 horas de reação, em função das concentrações de enzima e de lactose inicial	50
FIGURA 3 – Concentrações de lactose e GOS total (% p/v) no leite dos ensaios 2, 4 e 6 nos diferentes tempos de reação (0,5; 1; 1,5; e 2 horas).....	57
FIGURA 4 - Análise por CLAE-IR da amostra de leite UHT desnatado em 1,5 horas de reação a 30 °C, com concentração enzimática de 5 U.mL ⁻¹ e 10% (p/v) de lactose. Os picos correspondem a: (1) 6'-galactosil-lactose, (2) lactose, (3) 6-galactobiose, (4) glicose, e (5) galactose	59

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Composição bruta característica (kg.100 ⁻¹) de leites de vaca, ovelha, búfala e cabra.....	15
TABELA 2 - Diferentes tipos de galacto-oligossacarídeos (GOS) obtidos da lactose por reação de transgalactosilação	24
TABELA 3 - Condições de reação para diversas fontes de β -galactosidases empregadas para a produção de GOS	27

ARTIGO

TABELA 1 - Matriz do planejamento fatorial composto central rotacional 2 ³ com valores reais e codificados (entre parênteses) das variáveis	45
TABELA 2 - Resultados obtidos de concentrações de lactose final, glicose, galactose e GOS total no leite em 2, 4 e 6 horas de reação a partir do Planejamento Experimental 2 ³	48
TABELA 3 - Efeito das variáveis independentes (Enzima, Lactose inicial e Temperatura) sobre a hidrólise da lactose e formação de glicose e galactose em 2, 4 e 6 horas de reação	50

APÊNDICE A

TABELA 1 - Resultados obtidos de Conversão da lactose, 6'-galactosil-lactose e 6-galactobiose no leite em 2, 4 e 6 horas a partir do Planejamento Experimental 2 ³	65
TABELA 2 - Efeito das variáveis independentes (Enzima, Lactose inicial e Temperatura) sobre a conversão da lactose e formação de galacto-oligossacarídeos em 2, 4 e 6 horas ...	66
TABELA 3 - Resultados obtidos de Conversão da lactose, concentrações de lactose final, glicose e galactose no leite em 0,5, 1, 1,5 e 2 horas em 3 ensaios do Planejamento Experimental 2 ³	67
TABELA 4 - Resultados obtidos de concentrações de 6'-galactosil-lactose, 6-galactobiose e GOS total no leite em 0,5, 1, 1,5 e 2 horas nas condições de 3 ensaios do Planejamento Experimental 2 ³	67

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	PROBLEMA DE PESQUISA E HIPÓTESE	13
2.1	Problema de Pesquisa	13
2.2	Hipótese	13
3	REVISÃO DA LITERATURA	14
3.1	Leite	14
3.1.1	Composição	15
3.1.2	Leite UHT desnatado.....	16
3.2	Lactose	16
3.3	β-galactosidase	19
3.3.1	Classificação	19
3.3.2	Mecanismo de ação	20
3.3.3	Principais fontes	21
3.4	Galacto-oligossacarídeos (GOS)	23
3.4.1	Síntese enzimática	25
3.4.2	Benefícios à saúde	30
4	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32
	ARTIGO	39
1	INTRODUÇÃO	41
2	METODOLOGIA	43
2.1	Determinação da Atividade Enzimática	43
2.2	Determinação da Composição e das Propriedades Físico-químicas do Leite UHT Desnatado	43
2.3	Hidrólise da Lactose e Síntese de Galacto-oligossacarídeos (GOS)	44
2.4	Planejamento Experimental	45
2.5	Quantificação de Carboidratos	46
2.6	Análise Estatística	46
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
3.1	Composição e Propriedades Físico-químicas do Leite UHT Desnatado	47
3.2	Hidrólise da Lactose e Síntese de Galacto-oligossacarídeos (GOS)	47
3.2.1	Efeito da concentração de β -galactosidase	47
3.2.2	Efeito da concentração inicial de lactose no leite desnatado.....	50

3.2.3	Efeito da temperatura do processo	53
3.2.4	Efeito do tempo de processamento	54
3.3	Análise das Melhores Condições de Síntese de GOS	56
4	CONCLUSÃO	60
5	REFERÊNCIAS	61
APÊNDICE A	65

1 INTRODUÇÃO

O consumo de leite UHT sem lactose ou com teor reduzido tornou-se popular em diversas partes do mundo, uma vez que há um número significativo de pessoas que apresentam intolerância ou má digestão da lactose. A estas pessoas falta a quantidade de lactase necessária no intestino para hidrolisar a lactose em glicose e galactose, e assim serem absorvidas através do trato digestivo. Como resultado, a lactose atinge o cólon onde é fermentada, produzindo sintomas como gases, inchaço e diarreia (MATTAR, MAZO, 2010; WOOTEN, 2010).

Devido ao crescente interesse dos consumidores por este produto, o número de fábricas de laticínios que agregam aos seus serviços a produção deste tipo de leite também aumentou (ADHIKARI *et al.*, 2010). Para tal fim, Rodriguez-Colinas (2014) cita que β -galactosidases “Geralmente Reconhecidas como Seguras” (GRAS) são extensamente utilizadas na indústria de laticínios.

Além de hidrólise da lactose, β -galactosidases (EC 3.2.1.23) são capazes de catalisar uma reação de transgalactosilação na qual a lactose ou outros carboidratos servem como aceptores de galactosil, produzindo galacto-oligossacarídeos (GOS), carboidratos com função prebiótica e diferentes graus de polimerização e ligações glicosídicas (PARK, OH, 2010; TORRES *et al.*, 2010). A fonte da enzima e as condições de operação (concentração de lactose, atividade de água, temperatura, pH, etc.) assumem influência sobre o rendimento e a composição dos GOS sintetizados (IQBAL *et al.*, 2010; URRUTIA *et al.*, 2013). Em geral, o rendimento de GOS aumenta com a concentração de lactose (VERA *et al.*, 2012).

O pH do leite (aproximadamente 6,7) é adequado para a atividade de muitas β -galactosidases. A literatura é escassa quanto a formação de GOS durante o tratamento de leite com β -galactosidase e 5% de lactose (PURI *et al.*, 2010; RUIZ-MATUTE *et al.*, 2012; RODRIGUEZ-COLINAS *et al.*, 2012, 2014). As soluções de lactose tipicamente relatadas empregadas para promover a reação de transgalactosilação estão em concentrações entre 15-50% (p/v) (PADILLA *et al.*, 2012; RODRIGUEZ-COLINAS *et al.*, 2012; SHEN *et al.*, 2012; VERA *et al.*, 2012; GUERRERO, VERA, ILLANES, 2013; PALAI, BATTACHARYA, 2013). Trabalho feito por Rodriguez-Colinas (2014) demonstrou ser possível produzir quantidade considerável de GOS a partir da concentração de lactose natural em leite desnatado controlando o processo de hidrólise enzimática da lactose.

GOS são considerados ingredientes alimentícios prebióticos porque não são digeríveis, contribuindo de modo benéfico para saúde de quem o ingere por estimular

seletivamente o crescimento e/ou atividade de uma ou de um número limitado de bactérias no cólon (ROBERFORID, 2007). A síntese de galacto-oligossacarídeos ganhou interesse porque são estruturalmente semelhantes aos oligossacarídeos presentes no leite humano (HMO) (GONZÁLEZ *et al.*, 2008).

Diferentes trabalhos de pesquisa têm relatado os vários benefícios à saúde proporcionados pelos galacto-oligossacarídeos. Atualmente, o foco principal para esses prebióticos é a sua produção e utilização como um componente de alimentos funcionais (SANGWAN *et al.*, 2011).

A produção de GOS em leite já demonstrada vem alertar para a possibilidade de se melhorar as propriedades funcionais de um leite com baixo teor de lactose. Segundo Ruiz-Matute *et al.* (2012), um leite com teor de lactose residual menor do que 1 g.L^{-1} (0,1%, p/v) pode apresentar um conteúdo de GOS em torno de $7,8 \text{ g.L}^{-1}$ (0,78%, p/v), o qual seria suficiente para exercer um efeito benéfico à saúde nos consumidores. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2016) determina, no entanto, que a porção do produto pronto para consumo deve fornecer um mínimo de 2,5 g de fibras alimentares para que ofereça benefícios à saúde.

De acordo com o que foi apresentado, este trabalho teve como objetivo verificar a eficiência da conversão da lactose em galacto-oligossacarídeos (GOS) por via enzimática em leite UHT desnatado, investigando as melhores condições para obtenção de uma matéria-prima láctea com GOS e com teor reduzido de lactose. Não tem sido relatada a adição de lactose ao leite, sendo um dos principais pontos de observação neste estudo, além das condições de enzima, temperatura e tempo de processo. A possibilidade de oferecer um produto lácteo com prebiótico e teor reduzido de lactose poderia ser de interesse no mercado de lácteos, tendo em vista o desenvolvimento de produtos com as mesmas funcionalidades e benefícios à saúde.

2 PROBLEMA DE PESQUISA E HIPÓTESE

2.1 Problema de Pesquisa

Considerando que a produção de GOS tem a lactose como principal substrato, e que o incremento no teor de lactose no meio contribui para o aumento do rendimento de GOS, o problema da pesquisa é formulado da seguinte maneira:

De que forma pode-se melhorar a eficiência da conversão enzimática de lactose em Galacto-oligossacarídeos (GOS) em leite UHT desnatado?

2.2 Hipótese

O aumento da concentração de lactose em leite UHT desnatado resultará no aumento da eficiência da sua conversão enzimática em GOS com o controle das condições do processo (atividade enzimática, temperatura e tempo de processo).

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Leite

De acordo com a legislação brasileira, “entende-se por leite, sem outra especificação, o produto oriundo da ordenha completa e ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas.” O leite advindo de outras espécies animais deve ser denominado segundo a espécie de origem (BRASIL, 2011).

A pecuária leiteira e sua cadeia produtiva é uma das atividades mais importantes e tradicionais do meio rural brasileiro. O último censo agropecuário (IBGE, 2006) revela que no Brasil existem aproximadamente 5,2 milhões de estabelecimentos rurais, dos quais 25% (aproximadamente 1,35 milhões) produzem leite, envolvendo cerca de 5 milhões de pessoas.

Em 2010, a produção mundial de leite girou em torno dos 695,7 bilhões de litros, dos quais 4,42% (30,7 bilhões de litros) correspondem ao que foi produzido no Brasil. Entre 2000 e 2010 a produção cresceu em média 4,4% ao ano, sendo a segunda maior taxa anual de crescimento do mundo. A China ficou em primeiro lugar com uma taxa de 17,61% (EMBRAPA, 2011). Em 2013, o valor bruto da produção de leite chegou aos R\$ 22,9 bilhões, contribuindo para movimentar principalmente a economia das pequenas e médias cidades brasileiras (BRASIL, 2014).

A Embrapa (2013) destaca a relação do Brasil com o mercado externo. O país sempre foi um tradicional importador de lácteos, passando por períodos de superávit na balança comercial, sendo 2008 o último ano com essa condição. A partir de 2013, devido ao aumento do consumo interno, da crise econômica ocorrida em 2008, e da desvalorização do Real, a balança comercial de produtos lácteos do Brasil é negativa. Em 2012 ela fechou com um déficit de 51,835 milhões de dólares. A qualidade do produto lácteo brasileiro, muito afetada pela existência de doenças no rebanho bovino nacional, como brucelose e tuberculose já erradicadas pelos potenciais concorrentes do Brasil no mercado de lácteos, também é outro fator que impede o país de atingir mercados mais exigentes.

Apesar do aumento gradativo do consumo de leite e de produtos lácteos no país, o consumo médio da população brasileira ainda se encontra abaixo do recomendado pelo Ministério da Saúde e Organização Mundial da Saúde. Enquanto que no Brasil a produção de leite é capaz de fornecer cerca de 170 litros de leite/habitante/ano, estes órgãos recomendam que o consumo anual de leite, por pessoa, seja cerca de 210 litros de leite por ano (BRASIL, 2014).

3.1.1 Composição

O leite é considerado um alimento completo pois fornece nutrientes essenciais como minerais (cálcio, magnésio e selênio), vitaminas (A, D, riboflavina, vitamina B12 e ácido pantotênico), e açúcares (lactose), constituindo uma importante fonte de energia da dieta, com proteínas e gorduras de alta qualidade. Por serem alimentos ricos em nutrientes, o consumo de leite e produtos lácteos pode adicionar diversidade para dietas à base de vegetais (VUORISALO *et al.*, 2012; FAO, 2016).

A maior parte do leite é constituída pela água (87%), enquanto que os elementos sólidos representam 12 a 13% da composição do leite. Os sólidos totais (ST), ou extrato seco total (EST), englobam todos os componentes do leite exceto a água. Os sólidos não-gordurosos (SNG), ou extrato seco desengordurado (ESD), são todos os sólidos totais do leite exceto a gordura. Do teor total de sólidos, a gordura constitui cerca de 3 a 4%, as proteínas ficam em torno dos 3,5%, e a lactose representa um teor próximo dos 5%. No entanto, a composição do leite pode variar de acordo com o estágio de lactação, raça das vacas, alimentação, temperatura ambiente, manejo e intervalo entre as ordenhas, produção de leite e infecção da glândula mamária (EMBRAPA, 2005; FAO, 2016). A Tabela 1 exemplifica o teor médio dos principais constituintes do leite de diferentes animais.

Tabela 1 - Composição química (kg.100⁻¹) de leites de vaca, ovelha, búfala e cabra

	Vaca	Ovelha leiteira	Búfala	Cabra
Lipídeos	3,9	7,2	7,4	4,5
Proteína total:	3,2	4,6	3,8	3,2
Caseína	2,6	3,9	3,2	2,6
Proteínas do soro	0,6	0,7	0,6	0,6
Lactose	4,6	4,8	4,8	4,3
Cinzas	0,7	0,9	0,8	0,8
Sólidos totais	12,4	17,5	16,83	12,8

Fonte: adaptado de Eskin e Shaidi (2013)

A forma como esses elementos se distribuem e interagem é determinante para a estrutura, propriedades funcionais e aptidão do leite para determinado processamento. As micelas de caseína e os glóbulos de gordura são responsáveis pela maior parte das características físicas (estrutura e cor) dos produtos lácteos (EMBRAPA, 2005).

3.1.2 Leite UHT desnatado

A Portaria nº 146 de 07 de março de 1996, que aprova o Regulamento técnico de identidade e qualidade do leite UAT (UHT), define o leite UAT (Ultra Alta Temperatura, UHT) como o “leite homogeneizado que foi submetido, por 2 a 4 segundos, a uma temperatura de 130 °C mediante um processo técnico de fluxo contínuo, imediatamente resfriado a uma temperatura inferior a 32 °C e envasado sob condições assépticas em embalagens estéreis e hermeticamente fechadas” (BRASIL, 1996).

O leite UAT (UHT) pode ser classificado de acordo com o seu conteúdo de matéria gorda. Dessa forma, o leite UAT (UHT) poderá ser denominado “integral” (mínimo de 3% de gordura), “semi ou parcialmente desnatado” (0,6 a 2,9% de gordura), e “desnatado” (máximo de 0,5% de gordura). As expressões "longa vida" e/ou "homogeneizado" poderão ainda ser acrescentadas (BRASIL, 1996).

Haq *et al.* (2014) informam que o leite desnatado, o tipo de leite com teor reduzido ou ausência de gordura, obtido pela separação do creme, pode ser facilmente consumido por todos. É utilizado em diversos produtos alimentícios como queijo, bebidas lácteas, bolos, pães, etc. Considerando o teor de lactose, proteínas, cálcio e outros minerais, aumenta o valor nutritivo dos produtos. Constitui uma excelente alternativa para aqueles que adotam o consumo reduzido de gordura na dieta.

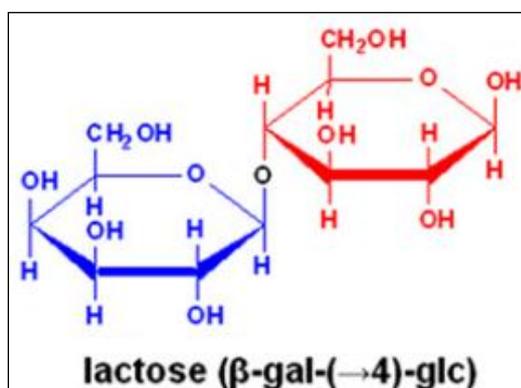
3.2 Lactose

A lactose (β -D-galactopiranosil-(1-4)-D-glicopiranosose) é o principal carboidrato presente em leite e derivados. É produzida pelas células epiteliais da glândula mamária, constituindo a principal fonte de energia dos recém-nascidos mamíferos. Todos os carboidratos são constituídos por unidades de sacarídeos, e a lactose é formada por duas unidades, a glicose e a galactose, unidas por uma ligação glicosídica do tipo β -1,4 (SCHILIME, BUCHHEIM, 2002; EMBRAPA, 2005). A estrutura química da lactose está representada pela Figura 1.

Cerca de 70% da população mundial possui problemas com assimilação da lactose (má absorção ou intolerância). No Brasil, a ocorrência de intolerância à lactose situa em torno dos 57%, com prevalência de 8% a 45% nas regiões sudeste e sul do país (PRETTO *et al.*, 2002; PEREIRA, FURLAN, 2004). A má digestão da lactose ocorre devido a um declínio na atividade da enzima β -galactosidase no intestino. Quando o indivíduo apresenta esse quadro, a lactose chega ao intestino delgado e não é hidrolisada, promovendo

sintomas com severidade variada, tais como: dor abdominal, diarréia, náuseas e flatulências (MATTAR, MAZO, 2010; WOOTEN, 2010; BURGAIN *et al.*, 2012).

Figura 1 – Estrutura química da lactose



Fonte: adaptado de Shen *et al.* (2012)

A lactase não persistente ocorre em aproximadamente 65% da população adulta, podendo ser secundária e reversível, não relacionada à genética. Ocorre quando a borda da escova jejunal pode ser afetada por alguma doença gastrointestinal (doença celíaca, doença de Crohn, gastroenterite aguda). Assim, quando a inflamação acaba, a produção de lactase recomeça. Isto resulta na presença de lactose não absorvida no trato gastrointestinal que pode produzir dois efeitos indesejáveis: aumento da carga osmótica com aumento do conteúdo de água no intestino, e a fermentação da lactose pela microbiota do cólon, levando a uma produção de gás aumentada. O processo decorrente da lactose não persistente difere-se da alactasia congênita que é a ausência de lactase desde o nascimento, extremamente rara e potencialmente fatal, sendo apenas 40 casos relatados (SWALLOW, 2003).

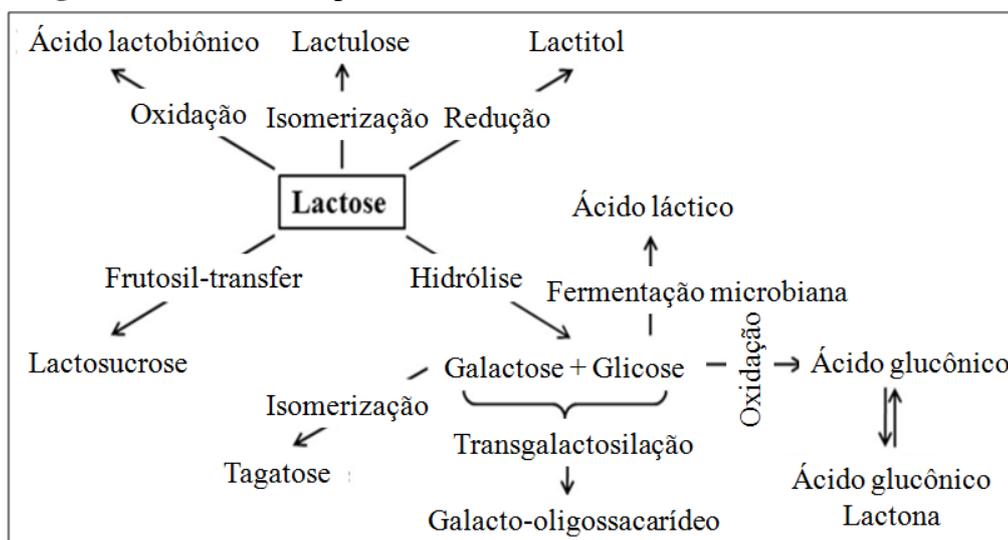
O limiar de tolerância da lactose depende de vários fatores relacionados à quantidade consumida, tempo de trânsito intestinal, presença de outros componentes da dieta no interior do lúmen gastrointestinal, consistência, temperatura, quantidade de lactase residual, e diversidade da microbiota gastrointestinal. Os sintomas de intolerância à lactose geralmente não ocorrem até que haja menos de 50% da atividade da lactase (SWALLOW, 2003). Na verdade, a maioria das pessoas com lactase não persistente pode tolerar pequenas quantidades de lactose na dieta quando é ingerida ao longo do dia e, no total, até 12-15 g/dia (LOMER, PARKES, SANDERSON, 2008).

A lactose, porém, está presente comumente em diversos alimentos e preparações industriais devido suas propriedades tecnológicas como fermentação, cristalização, entre outras. Para tentar combater o mal da intolerância a este carboidrato, as pessoas têm recorrido a algumas soluções terapêuticas e dietéticas como redução do consumo de alimentos com lactose, consumo de leite e derivados com ausência ou teor reduzido de lactose, ingestão de probióticos que sintetizam naturalmente a lactase, ou ingestão da própria enzima antes das refeições (BURGAIN *et al.*, 2012).

Em 2006, cerca de 870 mil toneladas de lactose na forma cristalina foram produzidas em todo o mundo, com uma taxa anual de crescimento entre 3 e 5% até 2012. Além disso, os panoramas contemporâneos econômicos e ambientais ditam que métodos eficazes devem ser desenvolvidos para explorar a lactose como matéria-prima renovável (SHEN *et al.*, 2012).

A bioconversão da lactose em derivados nutracêuticos tem sido um desafio. Várias substâncias como galacto-oligossacarídeos (GOS), lactulose, lactitol, lactosucrose, ácido lactobiônico, ácido glucônico, lactona, e tagatose são sintetizadas através de reações químicas e bioquímicas diferentes tais como hidrólise, transgalactosilação, oxidação, redução, isomerização, e hidrogenólise, a partir de matérias-primas ricas em lactose como o soro de leite. Nos processos de produção destas substâncias podem ser empregadas enzimas como biocatalisadores, ou podem ser desenvolvidos por outras vias como a fermentação microbiana (NATH *et al.*, 2016). A Figura 2 ilustra a formação de diversos produtos nutracêuticos que podem ser produzidos a partir da lactose.

Figura 2 – Diferentes tipos de nutracêuticos bioativos derivados da lactose



Fonte: adaptado de Nath *et al.* (2016)

3.3 β -galactosidase

A enzima β -galactosidase (E.C. 3.2.1.23 - β -D-galactosídeo-galactohidrolase) é denominada comumente de lactase devido a sua ação natural de catalisar a hidrólise da lactose em seus açúcares constituintes (PARK, OH, 2010). Estas enzimas têm várias aplicações nas indústrias de fermentação e produtos lácteos, e, principalmente por causa de sua capacidade de hidrolisar a lactose, elas têm atraído a atenção de pesquisadores e fabricantes de produtos lácteos (PADILLA *et al.*, 2012).

A utilização de β -galactosidasas microbianas que promovem reação de transgalactosilação tem sido uma das principais opções para bioconversão de lactose em importantes produtos comerciais. A aplicação varia quanto ao processo utilizado, sendo empregada em sua forma livre, em biorreatores de batelada convencionais, ou imobilizadas em matrizes especiais que revestem internamente biorreatores de leite (GONÇALVES, JOSÉ, RODRIGUES, 2010; SHEN *et al.*, 2011, 2012; NATH *et al.*, 2016).

3.3.1 Classificação

Gänzle (2012) informa que a classificação de β -galactosidasas pode ser tomada a partir das características estruturais e do mecanismo catalítico da enzima. Assim, as famílias glicosil-hidrolases (GH) são divididas e denominadas em GH1, GH2, GH35 e GH42.

A família GH1 compreende as fosfo- β -galactosidasas lacG, bem como as β -galactosidasas termoestáveis BglA com atividade sobre a lactose (KANG *et al.*, 2005). A família GH2 compreende as β -galactosidasas lacZ e lacLM de *E. coli* e de bactérias produtoras de ácido láctico. Estas enzimas são altamente específicas no resíduo β -galactosil, e utilizam como principais substratos a lactose e os galactosídeos com ligações do tipo β -1,3 ou β -1,6 (MATTHEWS, 2005).

As famílias GH35, à qual pertencem as enzimas derivadas do gênero *Kluyveromyces*, e GH42, que inclui as enzimas de *Bifidobacterium longum* e *pseudolongum*, utilizam como substrato uma variedade de glicosídeos com ligações β -1,2, β -1,4 e β -1,6. (TORRES *et al.*, 2010). Várias enzimas da família GH42 não hidrolisam lactose. Refletindo as especificidades quanto ao substrato, as β -galactosidasas das famílias GH42 e GH2 são frequentemente encontradas no mesmo organismo (van den BROEK *et al.*, 2008; SCHWAB, SØRENSEN, GÄNZLE, 2010).

3.3.2 Mecanismo de ação

Enzimas β -galactosidases, um tipo de glicosidases, agem como hidrolases por natureza (SHEN *et al.*, 2012). A enzima age sobre o terminal não redutor dos resíduos β -D-galactosil de oligossacarídeos e transfere o radical galactosil para aceptores adequados (PADILLA *et al.*, 2012).

Conhecer o mecanismo bioquímico para a atividade da enzima β -galactosidase se faz altamente relevante para a síntese de produtos como GOS, uma vez que explica como esta enzima, conhecida pela sua atividade hidrolítica, pode oligomerizar galactosídeos sob controle cinético. Este mecanismo também oferece uma visão sobre alguns dos fatores ambientais que influenciam a síntese e produção de GOS (GOSLING *et al.*, 2010).

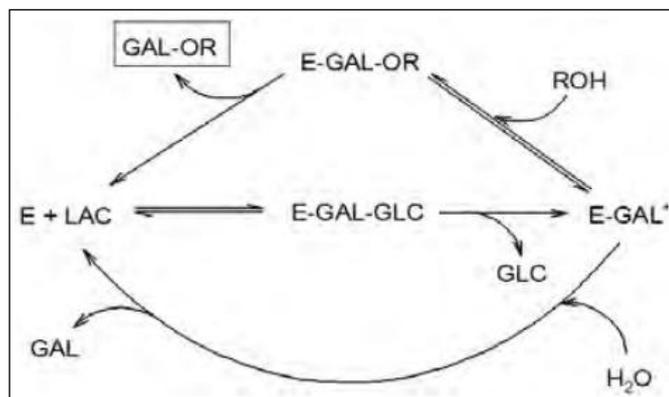
A primeira etapa durante a atividade da β -galactosidase é o encaixe de uma molécula de substrato pela formação de uma ligação covalente entre o radical galactosil do substrato e a enzima. Quando o substrato é a lactose, a porção glicana é o galactosil e a porção aglicana é o radical glicosil. Enquanto esta enzima mostra alta especificidade pelo substrato exigindo substratos com galactosil ligados por uma ligação glicosídica de estereoquímica beta, existe uma ampla especificidade para o radical aglicano. Têm sido relatadas características estruturais de β -galactosidases que são importantes em interações entre o substrato e o sítio ativo da enzima, e incluem grupos participantes da ligação de hidrogênio, um íon de sódio electrostaticamente ligado, e cadeias laterais de aminoácidos aromáticos que formam uma plataforma essencial para a ligação de hexoses como substratos (GLOSTER *et al.*, 2004; ISHIKAWA *et al.*, 2005).

Após a fixação do substrato no sítio ativo da β -galactosidase, a catálise pode ocorrer. É aceito que a reação ocorre com um mecanismo de retenção. Uma ligação covalente é formada entre o radical galactosil e a enzima, seguido por transferência para um aceptor nucleofílico. A via de reação diverge neste ponto. O resultado da reação depende da identidade do aceptor de galactosil, porque existe um amplo espectro de especificidade. Quando o aceptor de galactosil é a água, a galactose livre é liberada. A hidrólise do galactosídeo é então o resultado da reação, direcionando à degradação da lactose (GOSLING *et al.*, 2010).

A hidrólise enzimática da lactose produz principalmente glicose e galactose, mas quando a via da reação diverge em direção à transferência de galactosil a um aceptor que é um sacarídeo (glicose, galactose, lactose, ou uma molécula de GOS), galacto-oligossacarídeos também podem ser formados através de uma reação de transgalactosilação. Nesta reação, de forma interessante, este grupo de enzimas pode

catalisar a transferência da porção de galactose de um doador (geralmente a lactose) para uma molécula de carboidrato sob condições especiais utilizadas para a síntese de vários oligossacarídeos que contêm a fração de galactose (HSU *et al.*, 2007; GOSLING *et al.*, 2010). A Figura 3 esquematiza todo o mecanismo de reação de β -galactosidase sobre a lactose.

Figura 3 - Mecanismo de reação simplificado de β -galactosidase em lactose



E - enzima; LAC - lactose; GAL - galactose; GLC - glicose; ROH - aceitador de açúcar; GAL-OR - açúcar galactosil (galacto-oligossacarídeo). Fonte: Mahoney (1998)

Nath *et al.* (2016) pontua que a bioquímica do mecanismo de atividade catalítica, bem como a síntese de nutracêuticos a partir de lactose, depende de alguns parâmetros importantes, tais como a estrutura de enzimas, concentração de substrato, tipo e concentração de tampão, temperatura, pH, sistema de catálise, e configuração do reator.

A utilização da enzima β -galactosidase por parte da indústria apresenta uma importância comercial relevante. A partir das propriedades hidrolíticas e de síntese a partir da lactose, a atuação destas enzimas contribui para a redução do impacto ambiental associado ao descarte do soro, evita a cristalização da lactose em alimentos congelados, e permite o consumo de leite e derivados por indivíduos que tenham intolerância à lactose (MARÍN-NAVARRO *et al.*, 2014).

3.3.3 Principais fontes

Estas enzimas, apesar de relatadas ocorrências em fontes vegetais como amêndoas, damascos, pêssegos, peras, entre outros, (MAHONEY, 2003; DWEVEDI, KAYASTHA,

2009) são utilizadas principalmente de fontes microbianas para aplicações biotecnológicas, incluindo fungos (RODRIGUEZ-FERNANDEZ *et al.*, 2011; VERA *et al.*, 2012; FAI *et al.*, 2014), leveduras (PETROVA, KUJUMDZIEVA, 2010; SHEN *et al.*, 2012; PADILLA *et al.*, 2012; FAI *et al.*, 2014) e bactérias (GOSLING *et al.*, 2009; PALAI, MITRA, BATTACHARYA, 2012; RODRIGUEZ-COLINAS *et al.*, 2012). As condições ótimas do processo variam de acordo com o microrganismo em que esta foi extraída (RODRIGUEZ-COLINAS *et al.*, 2014; FRENZEL *et al.*, 2015).

Hoje em dia, β -galactosidases de origem microbiana representam uma viável alternativa para a síntese química de GOS com benefícios de estereo-especificidade enzimática com rendimento final superior. Estas enzimas têm sido frequentemente características de bactérias ácido-láticas e bifidobactérias relacionadas ao leite, produtos lácteos, e ao intestino de recém-nascidos (OSMAN *et al.*, 2011; SCHWAB *et al.*, 2011).

A Resolução RDC nº 26, de 26 de maio de 2009, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), aprova a lista de enzimas permitidas para uso em alimentos destinados ao consumo humano conforme a sua origem, em substituição ao anexo I da Resolução RDC nº 205 de 14 de novembro de 2006. A enzima lactase utilizada pela indústria brasileira de alimentos deve ser, portanto, de origem microbiana, proveniente dos fungos: *Aspergillus Níger*, *Aspergillus oryzae*, *Candida pseudotropicalis*, *Kluyveromyces fragilis*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus* e *Saccharomyces* sp., pois todos são considerados GRAS (“Generally Recognized as Safe”) (BRASIL, 2006, 2009).

Padilla *et al.* (2012) traz informações de que a espécie *Kluyveromyces lactis* recebeu uma atenção considerável por ser tanto um modelo genético e industrial de levedura, como uma fonte de metabólitos e enzimas diferentes. A espécie *Kluyveromyces marxianus* foi explorada por causa de suas potenciais aplicações biotecnológicas, embora o conhecimento sobre essa última seja menor comparado com o que se conhece sobre *K. lactis*. Ambas as espécies atuantes em produtos lácteos apresentam um bom rendimento de crescimento e uma maior atividade enzimática em comparação a outras leveduras. Assim, ambas as espécies são fontes industriais relevantes de atividade de β -galactosidase, e elas têm sido tradicionalmente utilizadas no desenvolvimento de produtos com teor reduzido de lactose e para o tratamento biológico de resíduos como o soro de queijo.

3.4 Galacto-oligossacarídeos (GOS)

Galacto-oligossacarídeos (GOS) são oligossacarídeos não digeríveis derivados da lactose por ação de β -galactosidases. GOS são considerados prebióticos por promoverem o crescimento de bactérias no intestino (MICHELON *et al.*, 2014) e licenciados como aditivo de alimentos FOSHU (“Foods for Specified Health Use”) pelo Ministério da Saúde do Japão (SAKO, MATSUMOTO, TANAKA, 1999). A ANVISA licencia o uso de GOS em fórmulas infantis (ANVISA, 2016), porém não são listados como ingredientes alimentícios com alegação de propriedade funcional e/ou de saúde, e sim os fruto-oligossacarídeos (FOS) (BRASIL, 2011).

As moléculas de GOS consistem em um número variável de unidades de galactose combinado a um resíduo de glicose terminal através de ligações glicosídicas, principalmente dos tipos β -1,4 e β -1,6. A estrutura geral de GOS pode ser representada como [galactose]_n-glicose, contendo de uma a sete unidades de galactose. Dissacarídeos compostos de galactose também são considerados GOS (TZORTIS, VULEVIC, 2009; GOSLING *et al.*, 2010; TORRES *et al.*, 2010).

Gosling *et al.* (2010) explicam que os GOS podem ter estruturas diferentes quanto ao grau de polimerização (Tabela 2), composição de sacarídeos, e região e natureza das ligações glicosídicas conforme ilustrado na Figura 4. Diferenças na região e natureza das ligações de GOS são controladas principalmente pela identidade da enzima utilizada e, provavelmente, também estão relacionadas com a estrutura e com o mecanismo de reação da enzima. As ligações entre açúcares nestas misturas são formadas e hidrolisadas a diferentes taxas, de modo que o tempo de reação influencia as estruturas presentes numa mistura de GOS. As diferenças estruturais dos GOS desencadeiam consequências importantes quanto às suas propriedades químicas, crescimento diferenciado de microrganismos probióticos, e afeta características relevantes para aplicações alimentares. O grau de polimerização (DP) influencia, principalmente, a eficácia prebiótica dos GOS e outras características relevantes (doçura e propriedades de gelificação) para a sua incorporação em produtos.

Tabela 2 – Diferentes tipos de galacto-oligossacarídeos (GOS) obtidos da lactose por reação de transgalactosilação

Dissacarídeo

β -D-Gal (1 \rightarrow 6)-D-Glc

β -D-Gal (1 \rightarrow 6)-D-Gal

β -D-Gal (1 \rightarrow 4)-D-Gal

β -D-Gal (1 \rightarrow 3)-D-Glc

β -D-Gal (1 \rightarrow 3)-D-Gal

β -D-Gal (1 \rightarrow 2)-D-Glc

Trissacarídeo

β -D-Gal (1 \rightarrow 6)- β -D-Gal (1 \rightarrow 4)-D-Glc

β -D-Gal (1 \rightarrow 6)- β -D-Gal (1 \rightarrow 6)-D-Gal

β -D-Gal (1 \rightarrow 3)- β -D-Gal (1 \rightarrow 4)-D-Glc

β -D-Gal (1 \rightarrow 4)- β -D-Gal (1 \rightarrow 4)-D-Glc

β -D-Galp-(1 \rightarrow 6)-[β -D-Galp-(1 \rightarrow 3)]-D-Glc

β -D-Galp-(1 \rightarrow 4)- β -D-Galp-(1 \rightarrow 2)-D-Glc

β -D-Galp-(1 \rightarrow 4)-[β -D-Galp-(1 \rightarrow 6)]-D-Glc

β -D-Galp-(1 \rightarrow 6)-[β -D-Galp-(1 \rightarrow 2)]-D-Glc

β -D-Galp-(1 \rightarrow 4)- β -D-Galp-(1 \rightarrow 3)-D-Glc

Tetrassacarídeo

β -D-Gal (1 \rightarrow 6)- β -D-Gal (1 \rightarrow 6)- β -D-Gal (1 \rightarrow 4)-D-Glc

β -D-Gal (1 \rightarrow 6)- β -D-Gal (1 \rightarrow 3)- β -D-Gal (1 \rightarrow 4)-D-Glc

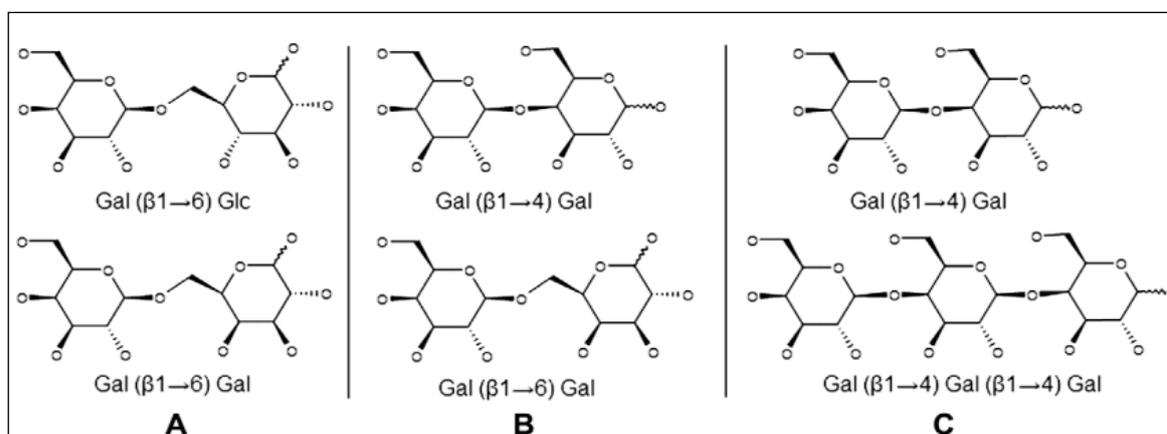
β -D-Gal (1 \rightarrow 3)- β -D-Gal (1 \rightarrow 6)- β -D-Gal (1 \rightarrow 4)-D-Glc

Pentassacarídeo

β -D-Gal (1 \rightarrow 6)- β -D-Gal (1 \rightarrow 6)- β -D-Gal (1 \rightarrow 6)- β -D-Gal(1 \rightarrow 4)-D-Glc

Gal – galactose; Glc – glicose; Galp - galactopiranosil. Fonte: Nath *et al.* (2016).

Figura 4 – Diferentes estruturas de GOS



A - composição de sacarídeos; B - região e natureza de ligações glicosídicas; C - grau de polimerização; Gal – galactose; Glc – glicose. Fonte: Gosling *et al.* (2010)

3.4.1 Síntese enzimática

A formação de GOS ocorre preferencialmente via síntese enzimática a partir de substratos ricos em lactose envolvendo enzimas glicosiltransferases (EC 2.4) ou glicosídeo-hidrolases (EC 3.2.1) como biocatalisadores (TORRES *et al.*, 2010). Dentro deste último grupo, a enzima β -galactosidase (EC 3.2.1.23) é capaz de sintetizar galacto-oligossacarídeos através de um mecanismo de transgalactosilação. Outras alternativas de processo de fermentação de substratos ricos em lactose, além da utilização de enzimas purificadas, são a utilização de células viáveis ou de enzimas imobilizadas (PANESAR, KUMARI, PANESAR, 2010).

A reação de transgalactosilação e formação de GOS durante a conversão da lactose catalisada pela β -galactosidase foi observada pela primeira vez no início da década de 1950 (WALLENFELS, 1951). Esta reação tem despertado interesse nos últimos anos pelos efeitos prebióticos dos GOS, os quais podem ser empregados e denominados como ingredientes funcionais, sendo então utilizados numa variedade de produtos incluindo leite fermentado, produtos de panificação, geleias, confeitos e bebidas (WANG, 2009).

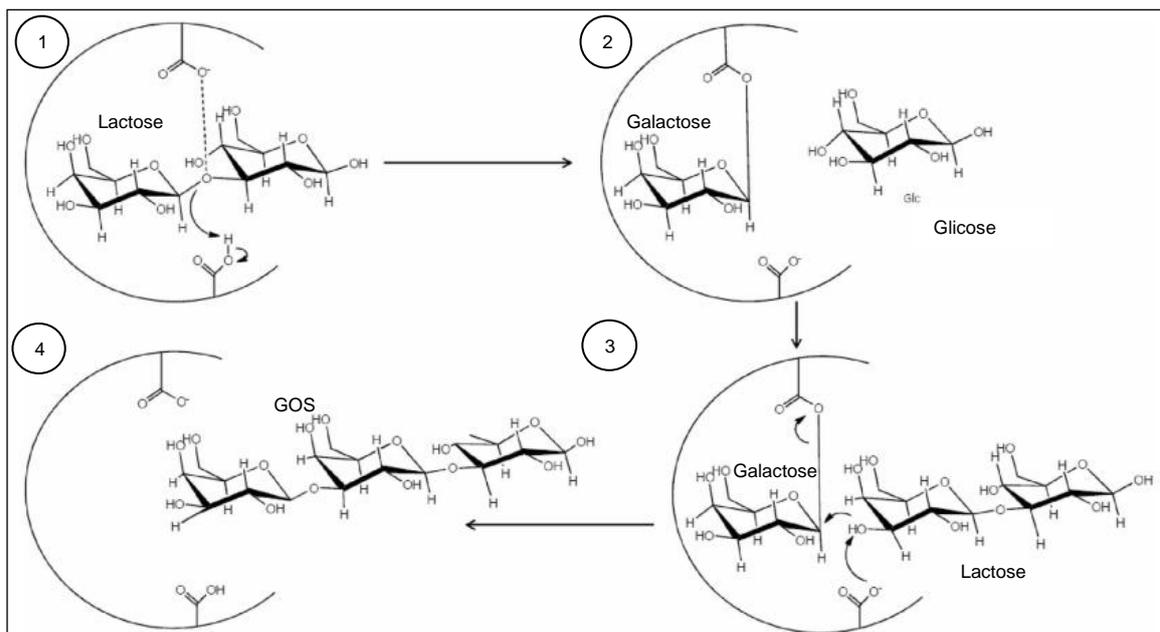
Tzortis e Vulevic (2007) destacam que a conversão da lactose em GOS por β -galactosidase é uma reação cineticamente controlada, havendo uma competição entre hidrólise e transgalactosilação. Especificamente durante esta conversão, a hidrólise da lactose é termodinamicamente favorecida, a qual gera D-galactose e D-glicose. A atividade hidrolítica compete com a atividade de transferase que gera uma mistura complexa de oligossacarídeos de estruturas diferentes baseados em galactose.

Durante o processo de transgalactosilação, ao contrário do que acontece durante a reação de hidrólise da lactose, a enzima, ao invés de transferir unidade de galactose para o grupo hidroxila da água, transfere para um composto hidroxilado que pode ser a galactose, lactose ou galacto-oligossacarídeos, resultando em oligossacarídeos com um grau mais elevado de polimerização (HSU *et al.*, 2007). A lactose atua como um doador do terminal galactosil, formando um complexo ativo enzima-galactosil que pode ser nucleofílicamente atacado tanto por uma molécula de água para a formação do produto de hidrólise, como por um receptor nucleofílico, exceto a água, para produzir o GOS pela formação de uma nova ligação glicosídica (GOSLING *et al.* 2010). A Figura 5 esquematiza este processo.

Gosling *et al.* (2010) explica que o mecanismo de transgalactosilação da β -galactosidase recebeu menos atenção comparado com o de hidrólise. Geralmente, os dados até então publicados sobre este mecanismo fazem inferências a partir da reação hidrolítica, e não é observada, diretamente, a transgalactosilação. Não se sabe se as interações no sítio

ativo diferem quando o aceptor é um sacarídeo comparado à água. No entanto, é bem conhecido que diferentes enzimas exibem diferentes seletividades para água e sacarídeos, como diferentes enzimas variam no rendimento de GOS com a mesma concentração de lactose. Parece provável que essa diferença nos rendimentos de GOS seja um resultado de diferenças estruturais e/ou de mecanismo entre β -galactosidases de diferentes fontes.

Figura 5 – Mecanismo de reação de síntese de galacto-oligossacarídeo (GOS) de lactose



1 – Ligação entre enzima e substrato; 2 – Complexo enzima-galactosil; 3 – Transgalactosilação com a lactose como aceptor do radical galactosil; 4 – Galacto-oligossacarídeo formado. Fonte: adaptado de Nath *et al.* (2016)

O mecanismo bioquímico de síntese de GOS, por ser bastante complexo, pode ser resumido da seguinte forma: o primeiro passo é a formação de um complexo enzima-galactosil e a simultânea liberação da glicose. Em uma segunda etapa, o complexo enzima-galactosil é transferido para um aceptor que contenha um grupo hidroxil (carboidratos), formando assim um oligossacarídeo derivado de galactose (TORRES *et al.*, 2010; MICHELON *et al.*, 2014).

A preferência de β -galactosidases para transgalactosilação sobre a hidrólise difere fortemente entre as enzimas, resultando em rendimentos e tamanhos diferentes de GOS sob diferentes condições de reação (SCHWAB, SØRENSEN, GÄNZLE, 2010). Fatores como origem da enzima e as condições de funcionamento da reação (concentração de lactose,

atividade de água, temperatura, pH, etc.) influenciam o rendimento e a composição do GOS sintetizado (Tabela 3) (IQBAL *et al.*, 2010; URRUTIA *et al.*, 2013).

Tabela 3 – Condições de reação para diversas fontes de β -galactosidases empregadas para a produção de GOS

Fonte	Temperatura (°C)	pH	Concentração de lactose (% p/v)	Rendimento de GOS (%)
<i>Aspergillus Níger</i>	40	7,0	2-30	16
<i>Aspergillus oryzae</i>	40-80	4,5-7,0	1-72	35
<i>Bacillus circulans</i>	40	6,0	4,3-36	6-48
<i>Escherichia coli</i>	30-37	6,5-7,5	2,2-24	44-56
<i>Thermus sp.</i>	70	7,0	7,5-30	40
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	30	6,5	21	39
<i>Lactobacillus reuteri</i>	30-37	6-6,5	4,6-21	26-38
<i>Penicillium simplicissimum</i>	50	6,5	30-60	30
<i>Kluyveromyces lactis</i>	24-50	5-7,5	5-40	38
	40	6,9-7,5	17-31	43
	40	6,5	8-32	28
	37	6,6	3-13	7,4
	35-45	7,0	14-23	22
	45	7,0	20	31
<i>Kluyveromices marxianus</i>	35-40	6,2-7,0	5-50	45
<i>Saccharopolyspora reactivirgula</i>	70	7,0	60	44
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	37-55	5-7,5	10-50	20-44
<i>Bifidobacterium angulatum</i>	55	7,5	5-30	44
<i>Bifidobacterium infantis</i>	30	6,5	36	49
<i>Bifidobacterium pseudolongum</i>	55	7,5	30	27
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	55	7,5	30	43
<i>Rhodotorula minuta</i>	30-60	5,0-6,0	20-36	39-64

Fonte: adaptado de Torres *et al.* (2010)

Por ser uma reação cineticamente controlada, a síntese enzimática de GOS é altamente dependente das propriedades da enzima. A origem da enzima tem influência marcante na conversão do substrato, na produtividade e na distribuição de produtos (TORRES *et al.*, 2010). β -galactosidases de origens distintas refletem essa diferença quanto à sua seletividade à água e a moléculas de açúcar, resultando em rendimentos de GOS, estruturas e tipos de ligações glicosídicas diferentes mesmo atuando em meios com

as mesmas concentrações iniciais de lactose (GOSLIN *et al.*, 2010; OTIENO *et al.*, 2010).

Torres *et al.* (2010) afirmam ser a concentração inicial de lactose a variável mais importante, independentemente da fonte de enzima, em concentrações superiores a 30% (p/v), favorecendo assim a síntese de GOS em detrimento da hidrólise, de modo a aumentar o rendimento. Se a concentração de lactose no sistema for alta, as moléculas de lactose e dos demais oligossacarídeos têm mais chances de atuarem como aceptores do complexo enzima-galactosil, formando assim os GOS (MICHELON *et al.*, 2014). Alguns trabalhos (PALAI, MITRA, BATTACHARYA, 2012; VERA *et al.*, 2012; PALAI, BATTACHARYA, 2013) comprovaram este fato. As concentrações mais elevadas de lactose podem produzir um aumento do rendimento da síntese, embora haja uma diminuição na produção de GOS em concentrações de lactose acima de 40% (p/v).

Sabe-se que soluções supersaturadas de lactose podem ser facilmente obtidas dentro de um estado metaestável. As concentrações mais elevadas de lactose (2,1 vezes mais sua concentração de saturação) direcionam a solução a um estado instável, podendo ocorrer espontaneamente a precipitação da lactose (WALSTRA, WOUTER, GEURTS, 2006). Vera *et al.* (2012) concluíram que a precipitação da lactose leva a um declínio na sua concentração, diminuindo assim o rendimento de síntese.

A solubilidade da lactose em altas concentrações é fortemente dependente da temperatura. Entretanto, o uso de altas temperaturas é limitado pela estabilidade da enzima, influenciando o rendimento da reação. Em meios com maior concentração de lactose, o rendimento de GOS e a produtividade específica aumentam com a temperatura. Além de aumentar a solubilidade da lactose, a temperatura aumenta as taxas de reação (VERA *et al.*, 2012) e parece ocasionar a formação de tipos superiores de GOS (PALAI, MITRA, BATTACHARYA, 2012). Temperaturas mais baixas tendem a prolongar o tempo de reação até alcançar o rendimento máximo de GOS (RODRIGUEZ-COLINAS *et al.*, 2014).

O pH e o tipo de processo também podem influenciar a formação de GOS a partir da lactose (INTANON *et al.*, 2014; FRENZEL *et al.*, 2015). A temperatura e o pH do processo são determinados, principalmente, pela origem microbiana da enzima empregada, a fim de garantir que a mesma atue ao máximo durante todo o tempo de processo. Vera, Guerrero e Illanes (2011) verificaram, entretanto, que se a temperatura e o pH forem compatíveis com a atividade e a fonte da enzima, não têm nenhum efeito significativo sobre o rendimento de síntese e de distribuição de produtos.

Em particular, a β -galactosidase da levedura mesófila *Kluyveromyces lactis*, que tem sido amplamente estudada devido à sua alta atividade de hidrólise de lactose e seu habitat (PARK, OH, 2010; RODRIGUEZ-COLINAS *et al.*, 2012), tem revelado produzir principalmente dissacarídeos (allolactose e β -1,6-galactobiose) e trissacarídeos (6'-galactosil-lactose) (MARTÍNEZ-VILLALUENGA *et al.*, 2008; RODRIGUEZ-COLINAS *et al.*, 2011). Esta enzima vem sendo empregada para a produção de GOS em temperaturas que vão de 30 °C (LISBOA *et al.* 2012; RUIZ-MATUTE *et al.*, 2012) a 50 °C (RODRIGUEZ-FERNANDEZ *et al.*, 2011; PADILLA *et al.*, 2012), sendo a temperatura de 40 °C mais próxima da sua temperatura ótima de trabalho (LISBOA *et al.*, 2012; GUERRERO, VERA, ILLANES, 2013; RODRIGUEZ-COLINAS *et al.*, 2014; FRENZEL *et al.*, 2015). Esta mesma enzima atua, geralmente, numa faixa de pH 6,5 (RODRIGUEZ-FERNANDEZ *et al.*, 2011; PADILLA *et al.*, 2012; GUERRERO, VERA, ILLANES, 2013; FISCHER, KLEINSCHMIDT, 2015) a 7,5 (FRENZEL *et al.*, 2015), sendo o pH do leite (próximo a 6,7) bastante favorável à atividade desta enzima.

O tempo da reação também exerce influência sobre o rendimento de síntese de GOS. Palai, Mitra e Battacharya (2012) observaram que há uma maior produção de GOS nos estágios iniciais de reação, enquanto que, com o avançar do tempo, há um rápido decréscimo na produção de GOS e um aumento das quantidades de galactose e glicose. No início da reação, a baixas concentrações de lactose, predomina a hidrólise, pois o radical galactosil teria uma maior probabilidade de anexar a água como um acceptor do que a lactose, ao passo que a transgalactosilação ocorre em concentrações mais elevadas de lactose.

Vera *et al.* (2012) constataram em seus experimentos que a proporção de enzima (*Aspergillus oryzae*) e substrato (lactose a 40%, p/v), dentro da faixa estudada (5 a 300 U.g⁻¹), não teve efeito significativo no rendimento e na produtividade de síntese de GOS. Entretanto, Manera *et al.* (2010) e Palai, Mitra e Battacharya (2012) sugerem um possível efeito da proporção entre enzima e substrato no rendimento e na produtividade. Dentro de uma reação cineticamente controlada, a produção máxima é determinada, portanto, pelos parâmetros cinéticos da enzima, e não pela sua concentração que somente afeta a taxa do rendimento obtido. Assim, a concentração de enzima influencia tanto a taxa de formação de GOS como a taxa de hidrólise da lactose.

3.4.2 Benefícios à saúde

Roberfroid (2007) define prebióticos como ingredientes alimentares não digeríveis que são seletivamente fermentados pela microbiota gastrointestinal humana permitindo alterações específicas tanto em sua composição como em sua atividade, conferindo benefícios ao bem-estar e à saúde.

Para ser definido como prebiótico, o produto deve ser resistente à digestão no intestino delgado e à hidrólise, e ser fermentado pelas bactérias desejáveis no cólon, e estimular de forma seletiva o crescimento desta mesma microflora, ou ter efeito bifidogênico (CHONG, 2014). Os prebióticos possuem um mecanismo de atuação fisiológica semelhante às demais fibras dietéticas (RASTALL, 2013; MICHELON *et al.*, 2014).

O perfil da composição de GOS produzido é de grande importância para a determinação dos seus benefícios. Particularmente, um estudo anterior objetivando avaliar a digestibilidade do GOS, verificou-se que os tri- e tetrassacarídeos não foram hidrolisados *in vitro* pela α -amilase salivar humana, pelo suco gástrico artificial, pela α -amilase pancreática de suíno, e por acetona intestinal de rato, enquanto que os dissacarídeos foram parcialmente digeridos pelas enzimas intestinais (CHONAN *et al.*, 2004; TORRES *et al.*, 2010). Por esta razão, o efeito prebiótico de GOS está associado principalmente aos trissacarídeos (tri-GOS) e tetrassacarídeos (tetra-GOS) (GOSLING *et al.*, 2010; TORRES *et al.*, 2010).

As propriedades prebióticas dos GOS, por sua vez, são reconhecidas por promoverem o crescimento de bifidobactérias e lactobacilos (RODRIGUEZ-COLINAS *et al.*, 2013), resultando em benefícios à saúde. Com o aumento da população de bifidobactérias no cólon e por efeito antagônico, há uma supressão da atividade de bactérias putrefativas, reduzindo a formação de metabólitos tóxicos. O aumento da biomassa microbiana resultante de sua fermentação contribui também para um aumento na frequência de evacuações, confirmando sua atuação como as fibras dietéticas (MONTILLA *et al.*, 2015).

Por serem resistentes ao processo digestivo no intestino delgado, os GOS são hidrolisados pelas bactérias a pequenos oligômeros ou monômeros. No processo metabólico de fermentação, os oligossacarídeos servem de fonte de energia para proliferação destes microrganismos, os quais geram gases (H_2 , CO_2 , CH_4) e pequenos ácidos orgânicos, tais como acetatos, butiratos, propionatos e lactatos (ROBERFROID, 2007). Esses ácidos graxos de cadeia curta, especialmente os butiratos, estimulam a

proliferação de células do epitélio do intestino e reduzem o pH lumial, contribuindo para o aumento da absorção de cálcio e minerais no intestino (RASTALL, 2013).

Muitos outros efeitos benéficos dos GOS são citados na literatura: estímulo à produção de nutrientes; aumento da umidade do bolo fecal através de pressão osmótica; inibição da diarreia; efeito protetor contra infecções nos tratos gastrintestinal, respiratório e urogenital; reduz a incidência de câncer colorretal; além de efeito benéfico no metabolismo de carboidratos e de lipídios promovendo a diminuição do conteúdo de colesterol no sangue (MUSSATTO, MANSILHA, 2007; CHONG *et al.*, 2014; BRUNO-BARCENA; AZCARATE-PERIL, 2015).

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADHIKARI, K. *et al.* Sensory characteristics of commercial lactose-free milks manufactured in the United States. **LWT - Food Science and Technology**, v. 43, p. 113–118, 2010.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Alimentos Com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde. **Portal ANVISA**, Brasília, mar. 2016. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/alimentos/alegacoes>> Acesso em: 30 ago. 2016.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC nº 44, de 19 de setembro de 2011. Aprova o Regulamento técnico que estabelece os requisitos mínimos de identidade, composição, qualidade e segurança a que devem obedecer as fórmulas infantis de seguimento para lactentes e crianças de primeira infância. **Diário Oficial da União**, Brasília, 22 set. 2011.

_____. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC nº 205, de 14 de novembro de 2006. Aprova o Regulamento técnico sobre enzimas e preparações enzimáticas para uso na produção de alimentos destinados ao consumo humano conforme a sua origem, constante do anexo desta Resolução. **Diário Oficial da União**, Brasília, 17 nov. 2006.

_____. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC nº 26, de 26 de maio de 2009. Aprova a lista de enzimas permitidas para uso em alimentos destinados ao consumo humano conforme a sua origem, em substituição ao Anexo I da Resolução RDC nº 205 de 14 de novembro de 2006. **Diário Oficial da União**, Brasília, 27 mai. 2009.

_____. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Assessoria de Gestão Estratégica. **Plano Mais Pecuária**. 1. ed. Brasília, 2014. 32 p.

_____. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Instrução Normativa nº 62, de 29 de dezembro de 2011. Aprova o Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Cru Refrigerado, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Pasteurizado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel. **Diário Oficial da União**, Brasília, 30 dez. 2011.

_____. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Portaria nº 146 de 07 de março de 1996. Aprova os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade dos Produtos Lácteos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 11 mar. 1996.

_____. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). **Valor Bruto da Produção**. Brasília, jan. 2014. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/ministerio/gestao-estrategica/valor-bruto-da-producao>> Acesso: 02 mar. 2016.

van den BROEK, L. A. M. *et al.* *Bifidobacterium carbohydases* e their role in breakdown and synthesis of (potential) prebiotics. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 52, p. 146-163, 2008.

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

BURGAIN, J. *et al.* Maldigestion du lactose: formes cliniques et solutions thérapeutiques. **Cahiers de nutrition et de diététique**, v. 47, p. 201-209, 2012.

CHONAN, O. *et al.* Undigestibility of galactooligosaccharides. **Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi**, v. 51, p. 28-33, 2004.

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

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

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). Agência Embrapa de Informação Tecnológica. **Agronegócio do leite: Composição**. Brasília, 2005. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia8/AG01/arvore/AG01_128_21720039243.html> Acesso em: 01 mar. 2016.

_____. Embrapa Gado de Leite. **Conjuntura do Mercado de Lácteos**. Juiz de Fora, ano 6, n. 46, fev. 2013.

_____. **Sistemas de produção de leite para diferentes regiões do Brasil**. Juiz de Fora, 2011. Disponível em: <<http://www.cnpqgl.embrapa.br/sistemaproducao/>> Acesso em: 02 mar. 2016.

ESKIN, M. N. A.; SHAIDI, F. **Biochemistry of foods**. 3 ed. Oxford: Elsevier, 2013.

FAI, A. E. C. *et al.* Production of prebiotic galactooligosaccharides from lactose by *Pseudozyma tsukubaensis* and *Pichia kluyveri*. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 03, p. 343-350, 2014.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). **Dairy production and products: Milk composition**. Roma, 2016. Disponível em: <<http://www.fao.org/agriculture/dairy-gateway/milk-and-milk-products/milk-composition/en/#.VuKzTZwrLIU>> Acesso em: 11 mar. 2016.

FISCHER, J. *et al.* Optimization and modeling of lactose hydrolysis in a packed bed system using immobilized β -galactosidase from *Aspergillus oryzae*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 85-86, p. 178-186, 2013.

FRENZEL, M. *et al.* Comparison of the galactooligosaccharide forming activity of different β -galactosidases. **LWT - Food Science and Technology**, v. 60, p. 1068-1071, 2015.

GÄNZLE, M. G. Enzymatic synthesis of galacto-oligosaccharides and other lactose derivatives (hetero-oligosaccharides) from lactose. **International Dairy Journal**, v. 22, p. 116-122, 2012.

GLOSTER, T. M. *et al.* Structural Studies of the beta-glycosidase from *Sulfolobus solfataricus* in complex with covalently and noncovalently bound inhibitors.

Biochemistry, v. 43, n. 20, p. 6101–6109, 2004.

GONZÁLEZ, R. *et al.* Differential transcriptional response of *Bifidobacterium longum* to human milk, formula milk, and galactooligosaccharide. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, p. 4686-4694, 2008.

GOSLING, A. *et al.* Recent advances refining galactooligo-saccharide production from lactose. **Food Chemistry**, v. 121, n. 2, p. 307-318, 2010.

GUERRERO, C.; VERA, C.; ILLANES, A. Optimisation of synthesis of oligosaccharides derived from lactulose (fructosyl-galacto-oligosaccharides) with β -galactosidases of different origin. **Food Chemistry**, v. 138, p. 2225-2232, 2013.

HAQ, I. *et al.* Effect of heat treatments on sensory characteristics and shelf-life of skimmed milk. **African Journal of Food Science**, v. 8, n. 2, pp. 75-79, fev. 2014.

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

INGRAM, C. J. *et al.* Lactose digestion and the evolutionary genetics of lactase persistence. **Human Genetics**, v. 124, p. 579–91, 2009.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Censo Agropecuário 2006.

INTANON, M. *et al.* Nature and biosynthesis of galacto-oligosaccharides related to oligosaccharides in human breast milk. **FEMS Microbiology Letters**, v. 353, p. 89-97, 2014.

IQBAL, S. *et al.* β -galactosidase from *Lactobacillus plantarum* WCFS1: biochemical characterization and formation of prebiotic galacto-oligosaccharides. **Carbohydrate Research**, v. 345, p. 1408-1416, 2010.

IRAZOQUI, G. *et al.* Characterization of galactosyl derivatives obtained by transgalactosylation of lactose and different polyols using immobilized β -galactosidase from *Aspergillus oryzae*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 11302–11307, 2009.

ISHIKAWA, E. *et al.* Identification, cloning, and characterization of a *Sporobolomyces singularis* β -galactosidase-like enzyme involved in galacto-oligosaccharide production. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 99, p. 331-339, 2005.

ITAN, Y. *et al.* A worldwide correlation of lactase persistence phenotype and genotypes. **BMC Evolutionary Biology**, v. 10, 36p., 2010.

- KANG, S. K. *et al.* Three forms of thermostable lactose-hydrolase from *Thermus* sp. IB-21: cloning, expression, and enzyme characterization. **Journal of Biotechnology**, v. 116, p. 337-346, 2005.
- MAHONEY, R. R. Galactosyl-oligosaccharide formation during lactose hydrolysis: a review. **Food Chemistry**, v. 63, p.147-154, 1998.
- _____. **β -Galactosidase**. In: WHITAKER, J. R.; VORAGEN, A. G. J.; WONG, D. W. S. (Eds). Handbook of Food Enzymology, Edit. Marcel Dekker, Inc, NY. 2003.
- MANERA, A. P. *et al.* Galacto-oligosaccharides production using permeabilized cells of *Kluyveromyces marxianus*. **International Journal of Food Engineering**, v.6, n. 4, 2010.
- MARÍN-NAVARRO, J. *et al.* Immobilization of thermostable β -galactosidase on epoxy support and its use for lactose hydrolysis and galactooligosaccharides biosynthesis. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 30, n. 3, p. 989-998, mar. 2014.
- MARTÍNEZ-VILLALUENGA, C. *et al.* Optimization of conditions for galactooligosaccharide synthesis during lactose hydrolysis by β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* (Lactozym 3000L HP G). **Food Chemistry**, v. 107, p. 258-264, 2008.
- MATTAR, R.; MAZO, D. F. C. Intolerância à Lactose: mudança de paradigmas com a biologia molecular. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v. 56, n. 2, p. 230-236, 2010.
- MATTHEWS, B. W. The structure of *E. coli* β -galactosidase. **Comptes Rendus Biologies**, v. 328, p. 549-556, 2005.
- MICHELON, M. *et al.* Concentration and purification of galacto-oligosaccharides using nanofiltration membranes. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 49, p. 1953-1961, 2014.
- MONTILLA, A. *et al.* Presence of galactooligosaccharides and furosine in special dairy products designed for elderly people. **Food Chemistry**, v. 172, p. 481-485, 2015.
- NATH, A. *et al.* Synthesis of Lactose-Derived Nutraceuticals from Dairy Waste Whey - a Review. **Food and Bioprocess Technology**, v. 9, p. 16-48, 2016.
- OSMAN, A. *et al.* BbgIV is an important bifidobacterium β -galactosidase for the synthesis of prebiotic galactooligosaccharides at high temperatures. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 740-748, 2011.
- OTIENO, D. O. Synthesis of β -galactooligosaccharides from lactose using microbial β -galactosidases. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 9, p. 471-482, 2010.

- PADILLA, B. *et al.* Evaluation of oligosaccharide synthesis from lactose and lactulose using β -galactosidases from *Kluyveromyces* isolated from artisanal cheeses. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 5134–5141, 2012.
- PALAI, T.; BHATTACHARYA, P. K. Kinetics of lactose conversion to galacto-oligosaccharides by β -galactosidase immobilized on PVDF membrane. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 115, n. 8, p. 668-673, 2013.
- PALAI, T.; MITRA, S.; BHATTACHARYA, P. K. Kinetics and design relation for enzymatic conversion of lactose into galacto-oligosaccharides using commercial grade β -galactosidase. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 114, n. 4, p. 418-423, 2012.
- PANESAR, S.; KUMARI, S.; PANESAR, R. Potential applications of immobilized β -galactosidase in food processing industries. **Enzyme Research**, v. 473137, 16p., 2010.
- PARK, A. R.; OH, D. K. Galacto-oligosaccharide production using microbial β -galactosidase: current state and perspectives. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 85, p. 1279-1286, 2010.
- PEREIRA, F. D.; FURLAN, S. A. Prevalência de intolerância à lactose em função da faixa etária e do sexo: experiência do Laboratório Dona Francisca, Joinville (SC). **Revista Saúde e Ambiente**, v. 5, n.1, jun. 2004.
- PETROVA, V. Y.; KUJUMDZIEVA, A. V. Thermotolerant yeast strains producers of galactooligosaccharides. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 24, n. 1, p. 1612-1619, 2010.
- PRETTO, F. M. *et al.* Má absorção de lactose em crianças e adolescentes: diagnóstico através do teste de hidrogênio expirado com o leite de vaca como substrato. **Jornal de Pediatria**, v. 78, n. 3, p. 213-218, 2002.
- PURI, M. *et al.* Cell disruption optimisation and covalent immobilisation of β -D-galactosidase from *Kluyveromyces marxianus* YW-1 for lactose hydrolysis in milk. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 160, p. 98–108, 2010.
- RASTALL, R. A. Gluco and galacto-oligosaccharides in food: update on health effects and relevance in healthy nutrition. **Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care**, v. 16, n. 6, p. 675-678, 2013.
- ROBERFROID, M. Prebiotics: The concept revisited. **Journal of Nutrition**, v. 137, p. 830–837, 2007.
- RODRIGUEZ-COLINAS, B. *et al.* Analysis of fermentation selectivity of purified galacto-oligosaccharides by in vitro human faecal fermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, p. 5743–5752, 2013.
- _____. Galactooligosaccharides formation during enzymatic hydrolysis of lactose: Towards a prebiotic-enriched milk. **Food Chemistry**, v. 145, p. 388–394, 2014.

_____. Galacto-oligosaccharide Synthesis from Lactose Solution or Skim Milk Using the β -Galactosidase from *Bacillus circulans*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 6391-6398, 2012.

_____. Production of galacto-oligosaccharides by the β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*: Comparative analysis of permeabilized cells versus soluble enzyme. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 10477-10484, 2011.

RODRIGUEZ-FERNADEZ, M. *et al.* Detailed kinetic model describing new oligosaccharides synthesis using different β -galactosidases. **Journal of Biotechnology**, v. 153, p. 116-124, 2011.

RUIZ-MATUTE, A. I. *et al.* Presence of mono-, di- and galactooligosaccharides in commercial lactose-free UHT dairy products. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 28, p. 164-169, 2012.

SAKO, T; MATSUMOTO, K.; TANAKA, R. Recent progress on research and applications of non-digestible galactooligosaccharides. **International Dairy Journal**, v. 9, n. 1, p. 69-80, 1999.

SANGWAN, V. *et al.* Galactooligosaccharides: novel components of designer foods. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 4, p. 103–111, 2011.

SCHLIMME, E.; BUCHHEIM, W. **La leche y sus componentes: Propiedades químicas y físicas**. Zaragoza: Ascribia S.A., 2002. 121p.

SCHWAB, C.; SØRENSEN, K. I.; GÄNZLE, M. G. Heterologous expression of glycoside hydrolase family 2 and 42 β -galactosidases of lactic acid bacteria in *Lactococcus lactis*. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 33, p. 300-307, 2010.

_____. Production of galactooligosaccharides and heterooligosaccharides with disrupted cell extracts and whole cells of lactic acid bacteria and bifidobacteria. **International Dairy Journal**, v. 21, p. 748–754, 2011.

SHEN, Q. *et al.* Gelatin-templated biomimetic calcification for β -galactosidase immobilization. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 1565–1571, 2011.

_____. Enzymatic synthesis and identification of oligosaccharides obtained by transgalactosylation of lactose in the presence of fructose using β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. **Food Chemistry**, v. 135, p. 1547-1554, 2012.

TORRES, D. *et al.* Galacto-oligosaccharides: production, properties, applications, and significance as prebiotics. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 9, p. 438–54, 2010.

TZORTZIS, G; VULEVIC, J. **Galacto-oligosaccharide prebiotics**. In: CHARALAMPOPOULOS, D; RASTALL, R. A. (Editores). *Prebiotics and Probiotics Science and Technology*. New York: Springer, 2009. p. 207–44.

URRUTIA, P. *et al.* Detailed analysis of galactooligosaccharides synthesis with β -galactosidase from *Aspergillus oryzae*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, p. 1081-1087, 2013.

VERA, C; GUERRERO, C; ILLANES, A. Determination of the transgalactosylation activity of *Aspergillus oryzae* β -galactosidase: effect of pH, temperature and galactose and glucose concentrations. **Carbohydrate Research**, v. 346, p. 745–52, 2011.

VERA, C. *et al.* Synthesis of galacto-oligosaccharides by β -galactosidase from *Aspergillus oryzae* using partially dissolved and supersaturated solution of lactose. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 50, p. 188-194, 2012.

VUORISALO, T. *et al.* High lactose tolerance in north europeans: a result of migration, not in situ milk consumption. **Perspectives in Biology and Medicine**, Baltimore, v. 55, n. 2, p. 163-174, 2012.

WALLENFELS, K. Enzymatische synthese von oligosacchariden aus disacchariden. **Naturwissenschaften**, v. 38, n. 13, p. 306–307, 1951.

WALSTRA, P.; WOUTER, J.; GEURTS, T. **Dairy Science and Technology**. 2 ed. Florida: CRC Press, Taylor & Francis Group, 2006. p. 17–26.

WANG, Y. Prebiotics: present and future in food science and technology. **Food Research International**, v. 42, p. 8–12, 2012.

WOOTEN, W. J. Lactose Intolerance and Ethnic Prevalence. In: NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH. **Lactose Intolerance and Health**. Kensington: National Institutes of Health, p. 49-52, 2010.

ARTIGO

Processo enzimático de redução de lactose em leite UHT desnatado visando à obtenção de um produto lácteo com prebióticos

Priscila Barbosa Bezerra Nunes, Samara Alvachian Cardoso Andrade, Andreлина Maria Pinheiro Santos, Tânia Maria Sarmiento da Silva, Girliane Regina da Silva, Eriane de Castro Lima Machado

RESUMO

Galacto-oligossacarídeos (GOS) são oligossacarídeos com propriedades prebióticas sintetizados a partir de lactose. O objetivo foi investigar as melhores condições para obter um leite com GOS e teor reduzido de lactose. Foi proposto um planejamento experimental 2^3 com concentrações de lactose de 5, 7,5 e 10% (p/v), concentrações de enzima de 5, 7,5 e 10 U.mL⁻¹, e temperaturas a 30, 35 e 40 °C. A análise dos carboidratos foi realizada por CLAE-IR. A maior concentração enzimática e menor concentração de lactose favoreceram a atividade hidrolítica da enzima, enquanto a maior concentração de lactose e menor concentração enzimática favoreceram a formação de GOS no leite. A concentração inicial de lactose exerceu a maior influência no processo, enquanto que a temperatura exerceu menor influência. Foi obtido um produto lácteo desnatado com teor reduzido de lactose (0,66% p/v) com presença de GOS (0,96%, p/v) em 1,5 hora de processo, a 30 °C, com 10% (p/v) de lactose e 5 U.mL⁻¹ de enzima. A partir do controle do processo enzimático, pode-se desenvolver produtos lácteos com presença de prebióticos capazes de oferecer benefícios à saúde do consumidor.

Palavras-chave: β -galactosidase; *Kluyveromyces lactis*; Transgalactosilação; Prebiótico.

ABSTRACT

Galacto-oligosaccharides (GOS) are oligosaccharides with prebiotic properties synthesized from lactose. The objective was to investigate the best conditions to obtain a milk with GOS and reduced lactose content. It was proposed a experimental design 2^3 with lactose concentrations of 5, 7.5 and 10% (w/v), enzyme concentrations of 5, 7.5 and 10 U.mL⁻¹, and temperatures at 30, 35 and 40 °C. Carbohydrate analysis was performed by HPLC-IR. The higher enzymatic concentration and lower lactose concentration favored the enzyme hydrolytic activity, while the higher lactose concentration and lower enzymatic concentration favored the formation of GOS in milk. The initial lactose concentration exerted the greatest influence on the process, while the temperature had lower influence. It was obtained a skim milk product with reduced lactose (0.66% w/v) and GOS (0.96%, w/v) in 1.5 hour, at 30 °C, with 10% (w/v) of lactose and 5 U.mL⁻¹ of enzyme. From the control of the enzymatic process, can be developed dairy products with the presence of prebiotics capable of offering benefits to the health of the consumer.

Keywords: β -galactosidase; *Kluyveromyces lactis*; Transgalactosylation; Prebiotic.

1 INTRODUÇÃO

Grande parte da população mundial intolerante à lactose sofre com sintomas como gases, inchaço e diarreia. Frente a isto, o consumo de leite UHT e derivados sem lactose ou com o teor reduzido tornou-se popular em diversas partes do mundo (WOOTEN, 2010). O crescente interesse de consumidores por estes produtos contribuiu para um aumento do número de fábricas de laticínios que agregam aos seus serviços a produção deste tipo de leite e/ou derivados (ADHIKARI *et al.*, 2010).

Enzimas com capacidade de hidrólise da lactose, as β -galactosidases (EC 3.2.1.23), são extensamente empregadas nas indústrias de laticínios (RODRIGUEZ-COLINAS *et al.*, 2014). Estas enzimas, de forma interessante, além de conduzirem a hidrólise da lactose, são capazes de catalisar uma reação de transgalactosilação e sintetizar compostos prebióticos, os galacto-oligossacarídeos (GOS), com diferentes graus de polimerização e de ligações glicosídicas (PARK; OH, 2010; TORRES *et al.*, 2010).

Os GOS são reconhecidos como ingredientes alimentícios prebióticos pois estimulam seletivamente o crescimento e/ou atividade de uma ou de um número limitado de bactérias no cólon (ROBERFROID, 2007). Por promoverem o crescimento de bifidobactérias e lactobacilos no intestino, os GOS proporcionam efeitos benéficos à saúde como a redução do nível de colesterol, produção de vitamina, aumento da absorção de cálcio e prevenção do câncer de cólon (GUERRERO *et al.*, 2014; FISCHER, KLEINSCHMIDT, 2015; SANGWAN *et al.*, 2015).

Nos últimos tempos, é dada grande atenção aos alimentos funcionais e aos prebióticos por parte da tecnologia dos alimentos. A síntese de galacto-oligossacarídeos ganhou interesse por suas propriedades prebióticas (GONZÁLEZ *et al.*, 2008). A fonte da enzima e as condições de operação (concentração de lactose, atividade de água, temperatura, pH, etc.) exercem influência sobre o rendimento e a composição dos GOS sintetizados (IQBAL *et al.*, 2010; URRUTIA *et al.*, 2013).

O pH do leite (aproximadamente 6,7) é adequado para a atividade de muitas β -galactosidases. No entanto, a formação de GOS durante o tratamento do leite com β -galactosidase ainda é pouco descrita (PURI *et al.*, 2010; RUIZ-MATUTE *et al.*, 2012; RODRIGUEZ-COLINAS *et al.*, 2012, 2014), provavelmente devido ao fato do teor de lactose no leite ser cerca de 5% (p/v), valor este significativamente inferior comparado com soluções de lactose tipicamente relatadas, com concentrações entre 15-50% (p/v) empregadas para promover a reação de transgalactosilação (PADILLA *et al.*, 2012; RODRIGUEZ-COLINAS *et al.*, 2012; SHEN *et al.*, 2012; VERA *et al.*, 2012;

GUERRERO, VERA, ILLANES, 2013; PALAI, BATTACHARYA, 2013). No entanto, Rodriguez-Colinas *et al.*, (2014) demonstraram ser possível produzir quantidade considerável de GOS a partir da concentração de lactose natural em leite desnatado controlando o processo de hidrólise enzimática da lactose.

O presente trabalho teve como objetivo verificar a eficiência da conversão da lactose em galacto-oligossacarídeos (GOS) por via enzimática em leite UHT desnatado, investigando as melhores condições para obtenção de uma matéria-prima láctea com uma presença significativa de GOS e com teor reduzido de lactose. Não tem sido relatada a adição de lactose ao leite, sendo um dos principais pontos de observação neste estudo. A possibilidade de oferecer um produto lácteo com prebiótico e teor reduzido de lactose poderia ser de interesse no mercado de lácteos, tendo em vista o desenvolvimento de produtos com as mesmas funcionalidades e benefícios à saúde.

2 METODOLOGIA

A enzima β -galactosidase Lactozyme 2600L G3665, derivada de *Kluyveromyces lactis*, foi adquirida da Sigma-Aldrich[®] (São Paulo, SP, Brasil). O substrato o-nitrofenil- β -galactopiranosídeo (o-NPG) foi adquirido da AMRESCO LLC (Solon, OH, EUA). O leite UHT desnatado foi adquirido em comércio local da Região Metropolitana do Recife (PE, Brasil). A lactose monohidratada utilizada foi da Himedia[®] (Curitiba, PR, Brasil). Para as análises em CLAE-IR foram utilizados os padrões de glicose, galactose, lactose (Sigma-Aldrich[®], São Paulo, SP, Brasil), e dos galacto-oligossacarídeos 6-galactobiose e 6'-galactosil-lactose (Carbosynth Ltda., San Diego, CA, EUA).

2.1 Determinação da Atividade Enzimática

A atividade da β -galactosidase foi determinada pelo método de hidrólise do substrato o-nitrofenil- β -galactopiranosídeo (o-NPG). A metodologia utilizada (LIMA *et al.*, 2013), adaptada pelo tempo de reação, foi desenvolvida no Laboratório de Análises Físico-químicas do Departamento de Ciências Domésticas da Universidade Federal Rural de Pernambuco. Foram adicionados 100 μ L da enzima diluída a tubos de ensaio contendo 4 mL de solução de 1,25 mM de o-NPG em solução tampão de fosfato de potássio 50 mM e mantida a 37 °C durante 1 minuto. A reação foi interrompida por imersão dos tubos em água em ebulição por 5 minutos e depois em banho de gelo. A concentração do produto formado, o o-nitrofenol (o-NP), foi monitorada através de leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 420 nm. Uma unidade de β -galactosidase é definida como a quantidade de enzima que libera 1 μ mol de o-NP por minuto sob as condições do ensaio. A enzima empregada neste estudo apresenta uma atividade média de 18,26 U.mL⁻¹.

2.2 Determinação da Composição e das Propriedades Físico-químicas do Leite UHT Desnatado

A composição e algumas propriedades físico-químicas do leite UHT desnatado foram determinadas através do equipamento de ultrassom Master Mini - Analisador de leite da Akso Produtos Eletrônicos Ltda. (São Leopoldo, RS, Brasil) devidamente calibrado. Estas análises ocorreram no Laboratório de Biotecnologia do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco e no Laboratório de Técnica e Dietética do Departamento de Ciências Domésticas da Universidade Federal Rural de

Pernambuco antes do processo enzimático para determinar a quantidade de lactose a ser incrementada ao leite segundo o planejamento proposto. Além do teor de lactose, o equipamento determinou os teores de proteínas, gordura, sólidos, sólidos não gordurosos, e água adicionada. As propriedades físico-químicas determinadas pelo analisador de leite foram temperatura, ponto de congelamento e densidade. O pH do leite, entretanto, foi determinado separadamente através de um pH-metro digital previamente calibrado. As medições foram realizadas em triplicata.

2.3 Hidrólise da Lactose e Síntese de Galacto-oligosacarídeos (GOS)

Esta metodologia foi realizada no Laboratório de Biotecnologia do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco e no Laboratório de Técnica e Dietética do Departamento de Ciências Domésticas da Universidade Federal Rural de Pernambuco.

O sistema de reação para a hidrólise da lactose e síntese de GOS foi composto por leite UHT desnatado (20 mL), lactose em pó e enzima. As quantidades adicionadas em Erlenmeyers de 50 mL estavam de acordo com as concentrações estabelecidas no planejamento experimental proposto. Os frascos foram dispostos em incubadora rotatória, mantidos à temperatura constante de cada ensaio conforme o planejamento experimental, sob agitação de 200 rpm para todos os experimentos.

Numa primeira etapa, a fim de averiguar o poder de síntese de GOS da enzima, foram retiradas alíquotas de 4 mL a cada 2 horas dentro de um período de 6 horas de reação, submetendo as amostras a um banho térmico a 100 °C por 5 minutos para a inativação da enzima, e em seguida dispostos em banho de gelo.

A partir da análise estatística dos resultados obtidos na etapa anterior, foi inferido que seria importante uma investigação mais apurada do comportamento de síntese enzimática de GOS em intervalos de tempo dentro das 2 horas iniciais nos ensaios que ofereceram melhores condições para uma maior síntese de GOS. Desta forma, foram colhidas amostras de 4 mL do sistema de reação a cada 30 min, submetendo as amostras a um banho térmico a 100 °C por 5 minutos para a inativação da enzima, e em seguida dispostas em banho de gelo.

2.4 Planejamento Experimental

Foi utilizada a metodologia de superfície de resposta com a finalidade de investigar a influência das concentrações de enzima e de lactose, como também da temperatura de reação sobre a eficiência da conversão enzimática da lactose e produção de GOS em leite UHT desnatado. Os ensaios experimentais foram realizados de acordo com o planejamento fatorial completo 2^3 com 8 pontos fatoriais (níveis +1 e -1) e 3 pontos centrais (nível 0), totalizando 11 ensaios (Tabela 1). Os dados obtidos foram ajustados ao seguinte polinômio:

$$Y\phi(A, LT) \equiv \beta_0 + \beta_1 A + \beta_2 L + \beta_3 T + \beta_{12} AL + \beta_{13} AT + \beta_{23} LT \quad (\text{Equação 1})$$

Em que β_n são os coeficientes de regressão, y é a resposta em questão - Conversão da Lactose (%); Lactose final (% p/v); Glicose (% p/v); Galactose (% p/v); e Galactooligosacarídeo total (% p/v) - e A, L e T são as variáveis codificadas: Enzima (U.mL^{-1}); Lactose inicial (% p/v) e Temperatura ($^{\circ}\text{C}$), respectivamente.

Tabela 1 - Matriz do planejamento fatorial composto central rotacional 2^3 com valores reais e codificados (entre parênteses) das variáveis

Ensaio	Lactose inicial (% p/v)*	Enzima (U.mL^{-1})	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)
1	- (5,0)	- (5,0)	-(30)
2	+ (10)	-(5,0)	-(30)
3	- (5,0)	+(10)	-(30)
4	+ (10)	+(10)	-(30)
5	- (5,0)	- (5,0)	+(40)
6	+ (10)	-(5,0)	+(40)
7	- (5,0)	+(10)	+(40)
8	+ (10)	+(10)	+(40)
9	0 (7,5)	0 (7,5)	0 (35)
10	0(7,5)	0(7,5)	0(35)
11	0(7,5)	0(7,5)	0(35)

*Concentrações atingidas adicionando a diferença em relação ao teor de lactose do leite

A escolha das temperaturas, das concentrações de lactose e de enzima, foi baseada em dados da literatura ao que se refere a este assunto, conforme citados anteriormente.

2.5 Quantificação de Carboidratos

As análises dos sacarídeos lactose, glicose, galactose, 6'-galactosil-lactose e 6-galactobiose foram realizadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detecção por Índice de Refração (CLAE-IR) no Centro de Apoio à Pesquisa (CENAPESQ) da Universidade Federal Rural de Pernambuco. Foi utilizado o cromatógrafo líquido Shimadzu Prominence LC-20AT (Shimadzu, Kyoto, Japão), constituído por uma bomba quaternária LC-20AT, degaseificador DGU-20As, forno de coluna CTO-20AC, detector índice de refração RID-10A, autoinjeter (SIL-20A) e módulo de comunicação CBM-20A, controlado pelo software LcSolution. Utilizou-se uma coluna Rezex RCM – Monossacarídeo Ca²⁺ (8%) (300mm x 7,8mm x 8µm) da Phenomenex, temperatura de 85 °C, fluxo de 0,6 mL.min⁻¹, e como fase móvel água ultra pura com 5% (v/v) de metanol. O volume injetado foi de 10 µL para padrões e amostras.

Antes da injeção das amostras, estas passaram por um tratamento, o qual seguiu uma adaptação da metodologia de Silveira *et al.* (2015). Consistiu em adicionar 2 mL de cada alíquota em tubos Eppendorfs juntamente com 120 µL de solução de Carrez I (15,2 g de ferrocianeto de potássio trihidratado em 100 mL de água destilada) e 120 µL de solução de Carrez II (29,9 g de sulfato de zinco hepta-hidratado em 100 mL de água destilada), levados à centrifugação a 12000 rpm, durante 30 minutos. O sobrenadante resultante da centrifugação foi separado e congelado até o momento das análises dos açúcares por cromatografia líquida de alta eficiência. Antes de injetadas no equipamento, as amostras foram diluídas (1:4) e filtradas em filtros de membrana de nylon com poros de 0,45 µm de diâmetro.

A partir dos resultados das análises, pode-se calcular a conversão da lactose de acordo com a Equação 2 proposta por Hsu, Lee e Chou (2007), onde Lac_i = concentração inicial de lactose; Lac_t = concentração final de lactose; GOS_t = concentração final de GOS; Gli_t = concentração final de glicose; Gal_t = concentração final de galactose:

$$\text{Conversão de lactose (\%)} = \frac{\text{Lac}_i - \text{Lac}_t}{\text{Lac}_i} \times 100 \quad (\text{Equação 2})$$

2.6 Análise Estatística

Os resultados das análises de açúcares em CLAE-IR foram tratados estatisticamente de acordo com o programa computacional Statistica for Windows 7.0 (STATSOFT, 2004), adotando-se um nível de significância de 5% de probabilidade.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Composição e Propriedades Físico-químicas do Leite UHT Desnatado

O leite UHT desnatado utilizado no trabalho possui $4,77 \pm 0,09$ (% p/v) de lactose, com um teor de gordura de $0,31 \pm 0,06$ (% p/v), comprovando ser um leite UHT desnatado segundo a legislação (BRASIL, 1996). Com o pH de $6,67 \pm 0,02$, a atividade da β -galactosidase da *Kluyveromyces lactis* foi possivelmente favorecida, considerando que a atividade da β -galactosidase é mais estável na faixa de pH entre 6,5 e 7,0 (DAS *et al.*, 2015).

3.2 Hidrólise da Lactose e Síntese de Galacto-oligossacarídeos (GOS)

Em todos os ensaios houve intensa atividade catalítica da β -galactosidase, em 2 horas de reação, a redução de lactose variou entre 94,28% (ensaio 2) a cerca de 100% (ensaio 7) (Tabela 1, Apêndice A), tempo este em que houve produção de GOS, com o alcance máximo de 0,79% (p/v) (ensaio 2) (Tabela 2). A ação hidrolítica e de síntese da β -galactosidase no leite desnatado está diretamente relacionada às condições de reação como pH, concentração de enzima e de lactose, temperatura, e tempo de processamento.

3.2.1 Efeito da concentração de β -galactosidase

Após 2 e 4 horas de reação, verifica-se que a concentração de enzima exerceu influência significativa juntamente com a concentração inicial de lactose sobre a sua concentração final (Figura 1A e B e Tabela 3). Os ensaios com menor concentração enzimática (5 U.mL^{-1}) alcançaram menores valores de hidrólise da lactose (Tabela 1, Apêndice A), com conseqüentes concentrações de lactose e de GOS maiores ao fim dos tempos de reação (Tabela 2) se comparado aos ensaios com maior concentração enzimática (10 U.mL^{-1}) com a mesma concentração inicial de lactose e na mesma temperatura. Isto pode ser verificado ao comparar os ensaios 2 (5 U.mL^{-1}) e 4 (10 U.mL^{-1}), com o primeiro apresentando uma maior concentração de lactose e GOS ao final do processo (0,12% e 0,27%, p/v, respectivamente), enquanto o segundo com 0,05% (p/v) de lactose final e 0,15% (p/v) de GOS total, com a mesma concentração inicial de lactose (10%, p/v), a 30 °C. Isto sugere que quanto maior a concentração de enzima no leite, menor será a concentração de lactose ao final do processo, pois favorece a interação entre a enzima e o substrato, promovendo uma maior atividade hidrolítica.

Tabela 2 – Resultados obtidos de concentrações de lactose final, glicose, galactose e GOS total no leite em 2, 4 e 6 horas de reação a partir do Planejamento Experimental 2³

Ensaio	Lactose final (%, p/v)			Glicose (%, p/v)			Galactose (%, p/v)			GOS total (%, p/v)		
	2h	4h	6h	2h	4h	6h	2h	4h	6h	2h	4h	6h
1	0,05	0,00	0,00	2,7	2,6	2,90	2,54	2,54	2,58	0,17	0,08	0,08
2	0,56	0,20	0,12	4,58	4,43	4,83	3,73	4,05	4,59	0,79	0,42	0,27
3	0,00	0,00	0,00	2,22	2,48	2,69	2,51	2,43	2,64	0,09	0,02	0,03
4	0,27	0,08	0,05	4,83	4,67	4,80	4,28	4,47	4,70	0,49	0,21	0,15
5	0,02	0,00	0,00	2,57	2,6	2,42	2,47	2,59	2,37	0,09	0,03	0,03
6	0,32	0,11	0,05	4,65	4,92	4,58	4,08	4,69	4,50	0,56	0,25	0,16
7	0,00	0,00	0,00	2,62	2,43	2,57	2,59	2,42	2,60	0,03	0,01	0,02
8	0,11	0,02	0,02	4,7	4,92	4,90	4,42	4,81	4,77	0,26	0,11	0,11
9	0,16	0,05	0,03	3,72	3,85	3,71	3,44	3,72	3,60	0,31	0,14	0,10
10	0,12	0,03	0,02	3,69	3,52	3,73	3,41	3,41	3,65	0,30	0,15	0,11
11	0,14	0,04	0,01	3,62	3,71	3,73	3,35	3,6	3,65	0,31	0,14	0,10

Concentração de lactose = (% p/v)*; Concentração de enzima = (U.mL⁻¹); Temperatura = °C. Ensaio 1 – 5% (p/v), 5 U.mL⁻¹, 30 °C; Ensaio 2 – 10% (p/v), 5 U.mL⁻¹, 30 °C; Ensaio 3 – 5% (p/v), 10 U.mL⁻¹, 30 °C; Ensaio 4 – 10% (p/v), 10 U.mL⁻¹, 30 °C; Ensaio 5 – 5% (p/v), 5 U.mL⁻¹, 40 °C; Ensaio 6 – 10% (p/v), 5 U.mL⁻¹, 40 °C; Ensaio 7 – 5% (p/v), 10 U.mL⁻¹, 40 °C; Ensaio 8 – 10% (p/v), 10 U.mL⁻¹, 40 °C; Ensaio 9 = Ensaio 10 = Ensaio 11 - 7,5% (p/v), 7,5 U.mL⁻¹, 35 °C.

*Concentrações atingidas adicionando a diferença em relação ao teor de lactose do leite

h = horas de reação enzimática

Das *et al.* (2015) perceberam que o aumento da concentração de β -galactosidase aumentou a atividade hidrolítica da enzima em uma temperatura particular. Após um período inicial, a concentração de lactose reduz e, simultaneamente, a taxa da reação de hidrólise aumenta rapidamente a concentrações mais elevadas de enzima (PALAI, MITRA, BHATTACHARYA, 2012).

Em 2 horas de reação, a concentração de enzima teve efeito negativo na produção de GOS (Figura 2 e Tabela 3), pois a síntese de GOS ao longo do tempo foi inversamente proporcional à concentração enzimática. Maiores concentrações de enzima em relação à concentração de substrato favorecem a atividade hidrolítica em detrimento da transgalactosilação pela maior facilidade de ligação entre a enzima e as unidades de substrato para ocorrer a reação enzimática. Assim, o processo é conduzido a uma redução progressiva do rendimento de GOS em longos tempos de reação, uma vez que o substrato lactose foi esgotado. Uma tendência semelhante foi relatado por Martínez-Villaluenga *et al.* (2008).

Figura 1 - Superfície de resposta da concentração final da lactose em função das concentrações de enzima e de lactose inicial. A: Conversão em 2 horas; B: Conversão em 4 horas; C: Conversão em 6 horas

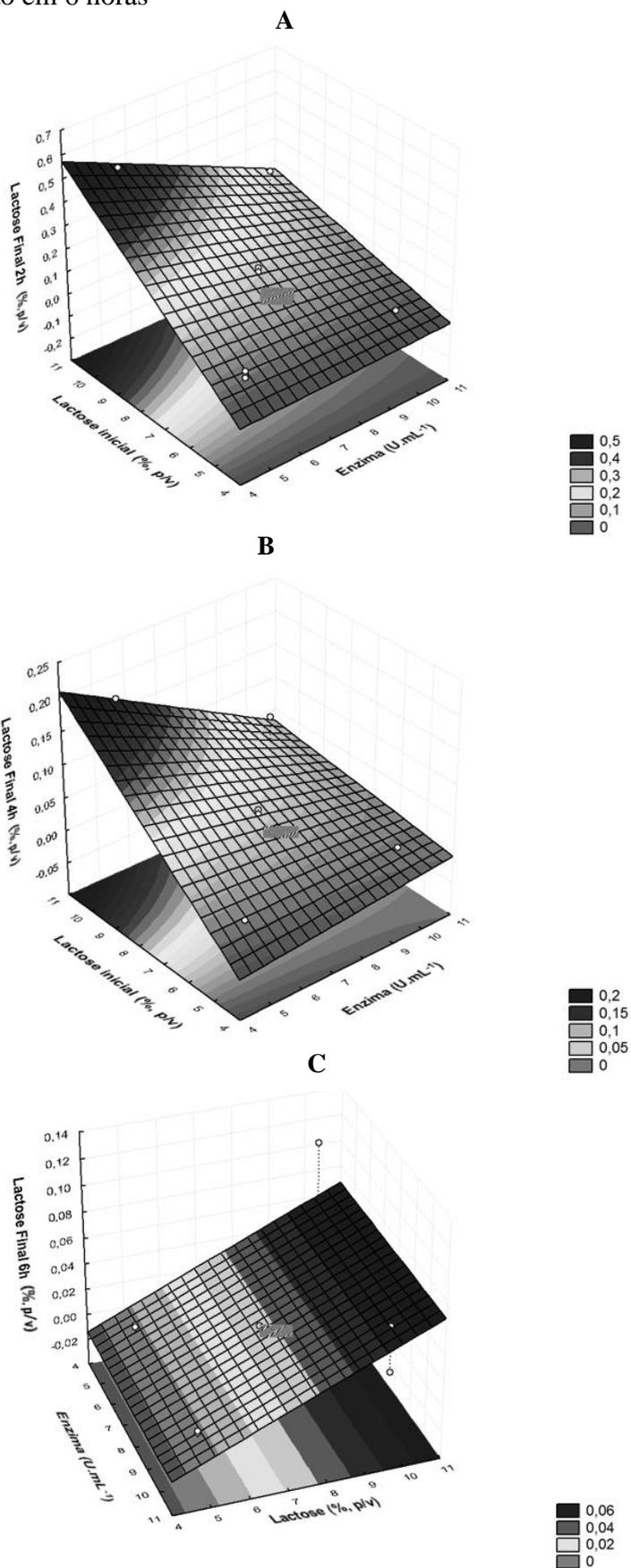


Figura 2 - Superfície de resposta da síntese de GOS total, em 2 horas de reação, em função das concentrações de enzima e de lactose inicial

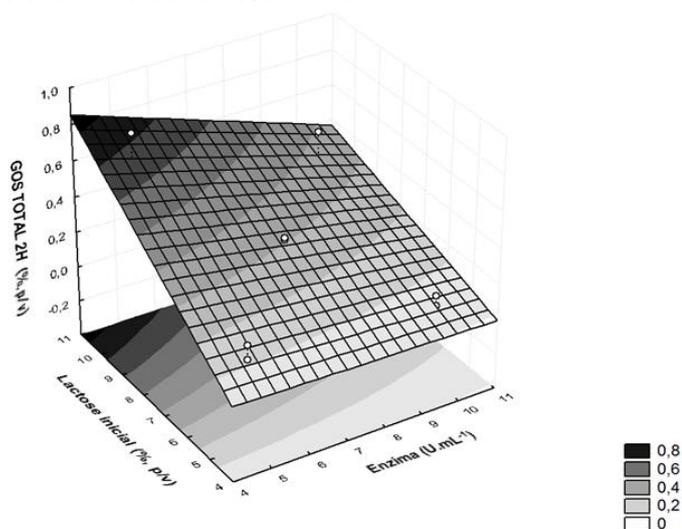


Tabela 3 - Efeito das variáveis independentes (Enzima, Lactose inicial e Temperatura) sobre a hidrólise da lactose e formação de glicose e galactose em 2, 4 e 6 horas de reação

Coeficiente	Lactose Final (% p/v)			Glicose (% p/v)			Galactose (% p/v)			GOS total (% p/v)		
	2h	4h	6h	2h	4h	6h	2h	4h	6h	2h	4h	6h
B₀	0,16	0,05	0,03	3,63	3,65	3,71	3,35	3,52	3,61	0,31	0,14	0,10
B₁	-0,14	-0,05	NS	NS	NS	0,06	0,24	NS	0,17	-0,18	-0,11	-0,06
B₂	0,3	0,1	0,06	2,16	2,21	2,13	1,6	2,01	2,09	0,43	0,21	0,13
B₃	-0,11	-0,04	NS	NS	NS	-0,19	NS	NS	NS	-0,15	-0,08	-0,05
B_{1,2}	-0,11	-0,05	NS	0,18	NS	0,09	0,2	NS	NS	-0,11	-0,07	-0,03
B_{1,3}	NS	NS	NS	NS	NS	0,18	NS	NS	NS	NS	0,03	0,03
B_{2,3}	-0,09	-0,04	NS	NS	NS	0,11	NS	NS	NS	-0,08	-0,05	-0,02
R²	0,991	0,984	0,96	0,991	0,993	0,999	0,994	0,991	0,999	0,999	0,999	0,996
R²ajust	0,977	0,959	0,901	0,978	0,983	0,999	0,985	0,98	0,987	0,999	0,997	0,990
Falta de ajuste	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	P<0,05	P<0,05	P<0,05

1: Enzima (U.mL⁻¹); 2: Lactose inicial (% p/v); 3: Temperatura (°C); NS: não significativo (p>0,05); h = tempo em horas do processo de reação enzimática

3.2.2 Efeito da concentração inicial de lactose no leite desnatado

A concentração inicial da lactose foi a variável que exerceu maior influência sobre a concentração final de lactose (Figura 1 e Tabela 3), independente do tempo de reação, e sobre a quantidade de GOS total sintetizado (Figura 2 e Tabela 3) em 2 horas. Em 6 horas

de reação, somente a concentração de lactose exerceu influência sobre o resíduo final da lactose, sendo este maior quanto maior a concentração inicial de lactose no leite desnatado. Verificou-se uma tendência de menos hidrólise nos ensaios com maior concentração inicial de lactose no leite (10%, p/v), com um rendimento maior de GOS total comparado aos ensaios com concentrações mais baixas (5%, p/v) (Tabela 2).

Observou-se nos ensaios 2 e 6 (5 U.mL⁻¹ de enzima, e 10%, p/v, de lactose no leite) na fase inicial de reação (2 horas) as menores taxas de redução da lactose (94,28% e 96,72%) e as maiores concentrações de GOS total (0,79 e 0,56%, p/v, respectivamente) (Tabela 2). Estes resultados são coerentes pelos ensaios atuarem em condições semelhantes, com menor concentração de enzima e maior concentração de lactose. Uma terceira melhor condição foi observada no ensaio 4 com as maiores concentrações de lactose (10%, p/v) e de enzima (10 U.mL⁻¹), a 30 °C, alcançando, em 2 horas, 0,49% (p/v) de GOS total no leite com 97,28% da lactose hidrolisada. Fischer *et al.* (2013) também obtiveram em seus resultados uma menor porcentagem de conversão da lactose ao empregar maiores concentrações de lactose no processo de hidrólise com a β-galactosidase imobilizada.

Nos ensaios 3 e 7 (10 U.mL⁻¹ de enzima e 5%, p/v, de lactose) verificou-se a maior redução de lactose no leite já nas primeiras 2 horas de processo, com concentrações finais tendendo a 0,0% (p/v). Entende-se então que estas condições - menor concentração de lactose para uma maior concentração de enzima - favoreceram a atividade hidrolítica da enzima. Estes resultados de hidrólise se assemelham ao obtido por Zhou *et al.* (2013), os quais alcançaram 99,3% da conversão da lactose em leite (4,65%, p/v), a 40 °C, com β-galactosidase derivada de *K. marxianus* (2,69 U.mL⁻¹), ao final de 3 horas de reação.

Desta forma, nos ensaios 3 e 7 não foram alcançadas quantidades significativas de GOS mesmo em 2 horas de reação (0,09 e 0,03%, p/v, respectivamente). Em baixas concentrações de lactose, a reação de hidrólise é favorecida em detrimento da transgalactosilação, estando a água mais disponível para agir como acceptor de grupo β-galactosil com produção de monossacarídeos (PALAI, BHATTACHARYA, 2013; PALAI, SINGH, BHATTACHARYA, 2014; VÉNICA *et al.*, 2015). Sen *et al.* (2014) relataram ainda que em menores concentrações de lactose a redução na formação de GOS pode ser decorrente da inibição da transgalactosilação por monossacarídeos.

As reações de hidrólise e transgalactosilação ocorrem simultaneamente e os produtos obtidos (glicose, galactose e GOS) dependem principalmente da concentração de lactose no meio reacional. Estes resultados demonstram que o aumento da concentração

inicial da lactose no leite desnatado proporcionou um aumento no rendimento de GOS por promover a reação de transgalactosilação. Isto pode ser explicado pelo fato de que grupos galactosil têm uma maior probabilidade de se ligar à lactose. A lactose pode competir de forma mais eficiente com a água como acceptor do radical β -galactosil quando em concentrações mais elevadas, ligando-se ao complexo enzima-galactose e formando GOS. Ao passo que, quando a concentração inicial de lactose aumenta, ocorre a diminuição da atividade de hidrólise e aumenta a formação de GOS. A influência positiva da concentração inicial da lactose sobre o rendimento de GOS está de acordo com outros autores (MARTÍNEZ-VILLALUENGA *et al.*, 2008; GOSLING *et al.*, 2010; TORRES *et al.*, 2010; PALAI, MITRA, BHATTACHARYA, 2012; GUERRERO, VERA, ILLANES, 2013; SEN *et al.*, 2014; VÉNICA *et al.*, 2015; GONZÁLEZ-DELGADO *et al.*, 2016; SEN, BHATTACHARJEE, BHATTACHARYA, 2016).

Khatami *et al.* (2014) observaram que um aumento na concentração de lactose provocava uma maior produção enzimática de lactulose (frutosil-oligossacarídeo derivado da lactose), uma vez que resulta em uma redução na atividade de água do meio, deslocando a reação em direção à síntese de moléculas de lactulose. Além disso, o aumento na concentração de lactose promove uma maior interação entre as moléculas de enzima e de lactose. Desta forma, mais complexos de enzima-substrato são produzidos e a probabilidade de produção de lactulose é aumentada. O mesmo pode ser colocado em relação aos galacto-oligossacarídeos.

Neste estudo, as concentrações de glicose e de galactose também foram mais influenciadas pela concentração inicial da lactose (Tabela 3). Em estudo feito por Palai, Mitra e Bhattacharya (2012), a formação de glicose no estado de equilíbrio foi mais ou menos independente da concentração inicial de lactose, justificado pelos autores pelo fato da glicose poder ser formada tanto no processo de transgalactosilação como durante a hidrólise. A quantidade inicial de lactose no meio é proporcional à quantidade de glicose que se forma com a hidrólise. Os autores também verificaram que a formação de galactose diminuía com o aumento da concentração inicial da lactose, comprovando a relação da transgalactosilação com as concentrações mais elevadas de lactose, resultando num maior rendimento de GOS. De forma semelhante, verificou-se no presente trabalho que, independente da duração do processo, a quantidade inicial da lactose influenciou o teor de glicose e galactose ao final da reação.

3.2.3 Efeito da temperatura do processo

A temperatura utilizada nos ensaios foi a variável que menos influenciou o processo de hidrólise da lactose com a produção de glicose e galactose (Tabela 3). Isto pode ser explicado pelas temperaturas serem compatíveis com a atividade e a origem da enzima utilizada, não tendo efeito significativo sobre a distribuição de produtos (VERA, GUERRERO, ILLANES, 2011).

Entre os fatores avaliados por Das *et al.* (2015), a temperatura foi o fator que mais apresentou influência sobre o processo de hidrólise da lactose, acompanhado pela concentração da enzima e o pH. Os autores explicaram que a temperatura altera a conformação da enzima, o que afeta a sua atividade e o processo de reação, e comentam que um aumento na temperatura causou um aumento inicial na hidrólise da lactose.

Em 2 horas de reação, há uma tendência de maior redução da lactose a 40 °C (ensaio 6 - 96,72%), ainda que discretamente, quando comparado a 30 °C (ensaio 2 - 94,28%) (Tabela 1, Apêndice A). A concentração de GOS total, entretanto, é inferior no ensaio 6 (0,56% p/v) em relação ao ensaio 2 (0,79%, p/v) (Tabela 2). A temperatura parece exercer um efeito negativo sobre o rendimento de GOS total ao longo do tempo de reação (Tabela 3). Quanto maior a temperatura de reação, menor a concentração de GOS no leite. Uma vez que a transgalactosilação é uma reação cineticamente controlada, os resultados sugerem que a temperatura de 40 °C pareceu favorecer, de forma seletiva, a atividade hidrolítica da β -galactosidase, enquanto que a 30 °C, nas mesmas condições de enzima e lactose, a reação de transgalactosilação parece ser promovida pelo maior rendimento de GOS alcançado (VERA *et al.*, 2011; DAS *et al.*, 2015). Em solução de lactose, diferentemente, Martínez-Villaluenga *et al.* (2008) e Torres *et al.* (2010) relataram que temperaturas mais elevadas melhoram a atividade da transgalactosilação e, conseqüentemente, rendimentos de GOS mais elevados.

O ensaio 8, com as máximas concentrações de enzima (10 U.mL⁻¹) e lactose (10%, p/v), a 40 °C, apresentou resultados de concentração de lactose ao final dos tempos de reação semelhantes aos ensaios 9, 10 e 11 com concentrações intermediárias de enzima (7,5 U.mL⁻¹) e de lactose (7,5%, p/v), a 35 °C (Tabela 2). Enquanto no ensaio 8 foram observadas maiores concentrações finais de glicose e galactose no leite, nos ensaios com temperatura a 35 °C foi observada uma maior concentração de GOS total no leite em 2 horas de reação. Aqui se reforça que a maior temperatura (40 °C) favoreceu a atividade hidrolítica da β -galactosidase, convertendo a lactose em glicose e galactose. Já em temperaturas inferiores, 30-35 °C, a atividade de síntese da enzima se mostrou mais

eficiente, visto as maiores concentrações de GOS total no leite ao empregar essas temperaturas, especialmente até 2 horas de reação.

3.2.4 Efeito do tempo de processamento

Apesar das 6 horas de duração de processamento, são nas 2 horas iniciais de processo que ocorre a maior redução de lactose no leite, com aumento das concentrações de glicose e galactose, e a síntese de GOS (Tabela 2). Isto pode ser explicado pela competição que se estabelece entre os processos de hidrólise e transgalactosilação. A transgalactosilação predomina na fase inicial de reação, isto é, quando há baixa conversão de lactose. Ao alcançar o teor máximo de GOS, a reação de hidrólise predomina (PALAI, MITRA, BHATTACHARYA, 2012).

Após as 2 horas iniciais, em todos os ensaios, as concentrações de glicose e galactose no leite continuam a aumentar, porém de forma mais discreta (Tabela 2). A partir deste tempo, quando a maior parte da lactose presente no leite foi hidrolisada, a reação atinge um platô pelo esgotamento de substrato, ficando este menos disponível para reagir com a enzima e formar produtos.

Além do esgotamento de substrato, os produtos da hidrólise da lactose (glicose e galactose) podem agir como inibidores da β -galactosidase. Durante a formação enzimática de GOS a partir de lactose, o acúmulo de glicose pode conduzir a uma inibição competitiva da β -galactosidase, competindo com a lactose como aceptor do radical galactosil (PESELA *et al.*, 2003; MATEO *et al.*, 2004, GÄNZLE, 2012; PALAI, BHATTACHARYA, 2013), ou agindo como um inibidor não competitivo (PARK, OH, 2010). Warmerdam *et al.* (2014) concluíram em seu estudo com β -galactosidase imobilizada que a inativação da enzima era melhor explicada com base na formação da glicose, tanto sobre a atividade de síntese como a de hidrólise.

O aumento da concentração de galactose também é um fator que pode conduzir à redução da atividade enzimática. A galactose é um forte inibidor de β -galactosidases por competir pelo sítio ativo destas enzimas (ANSARI, HUSAIN, 2012). A inativação por parte da galactose, no entanto, parece estar mais relacionada com a diminuição da taxa de hidrólise do que com a atividade de síntese de oligossacarídeos pela enzima (FISCHER *et al.*, 2013; WARMERDAM *et al.*, 2014).

A partir dos resultados, observou-se uma tendência de redução gradativa da concentração de GOS com aumento das concentrações de glicose e galactose no leite após

as 2 primeiras horas de reação (Tabela 2). Isto sugere, possivelmente, que a partir deste tempo haja uma predominância das reações de hidrólise da lactose direcionando à degradação de GOS pela β -galactosidase em tempos mais longos de catálise. A redução progressiva de GOS é relatada também em outros trabalhos (RODRIGUEZ-COLINAS *et al.*, 2012; PALAI, MITRA, BHATTACHARYA, 2012; PALAI, BHATTACHARYA, 2013; PALAI, SINGH, BHATTACHARYA, 2014; SEN, BHATTACHARJEE, BHATTACHARYA, 2016).

Palai, Mitra e Bhattacharya (2012) perceberam que a partir do alcance de 50% da conversão de lactose nas condições de estudo houve uma rápida diminuição na formação de GOS seguido do rápido aumento na formação de glicose e galactose.

Warmerdam *et al.* (2014) relataram uma rápida redução do teor de lactose em curtos períodos de tempo de hidrólise pela β -galactosidase. Observaram também que os teores de glicose, galactose, e GOS aumentaram em direção a um determinado nível ao longo do tempo de reação. Em tempos mais longos e de modo mais lento, houve a quase completa hidrólise da lactose em glicose e galactose, mesmo com a formação de GOS a uma baixa concentração de lactose, cerca de 5% (p/v). Em concentrações intermediárias de lactose (12%, 15%, e 25%, p/v), a conversão de lactose em GOS aumentou com o tempo de permanência da enzima imobilizada no leito dentro de um curto período. Em tempos mais longos de reação, os níveis de GOS diminuíram.

Sen *et al.* (2014) também observaram que a concentração de GOS aumenta até 1 hora de operação a 15% (p/v) de lactose. A partir de então, a concentração de GOS começa a reduzir, enquanto a hidrólise de lactose aumenta progressivamente com o passar do tempo de reação. Este comportamento é esperado, uma vez que, com a passagem de tempo, ocorre a diminuição contínua da concentração de lactose. Os autores explicam que os resultados antagônicos de diminuição na concentração de GOS e aumento na porcentagem de conversão de lactose ocorrem, possivelmente, devido ao predomínio da via reversível da reação de transgalactosilação. Isto resulta na degradação simultânea de GOS em monossacarídeos.

As melhores condições para a obtenção de uma matéria-prima láctea que pode ser classificada como “isenta de lactose” de acordo com a RDC n. 135, de 08 de fevereiro de 2017, adotada pela ANVISA que altera a Portaria SVS/MS nº 29, de 13 de janeiro de 1998 já que alcançaram um teor de lactose inferior a 0,1% (p/v) (BRASIL, 2017), foram identificadas nos ensaios 1, 3, 5 e 7, em 2 horas de reação. Neste tempo, o produto lácteo resultante dos demais ensaios pode ser denominado como sendo de “baixo teor de lactose”,

pois contêm um teor de lactose entre 0,1 e 1% (p/v). Apenas no ensaio 2 foi verificada a quantidade máxima de GOS total ao fim de 2 horas de reação (0,79%, p/v). Segundo Ruiz-Matute *et al.* (2012), um leite que possa apresentar um conteúdo de GOS em torno de 7,8 g.L⁻¹ (0,78%, p/v) poderia ser suficiente para exercer um efeito benéfico à saúde dos consumidores.

Os produtos lácteos resultantes dos ensaios enzimáticos no leite desnatado, poderiam ser alternativas de consumo para quem apresenta intolerância ou má digestão da lactose. Além disso, mesmo contendo um teor residual de lactose no leite de 0,56% (p/v) em 2 horas de reação, o ensaio 2 poderia oferecer condições para obter um leite, matéria-prima ou derivado lácteo com teor reduzido de lactose e, pelo conteúdo de GOS e suas propriedades prebióticas, com um benefício adicional à saúde dos consumidores.

3.3 Análise das Melhores Condições de Síntese de GOS

Considerando os melhores resultados para a síntese de GOS nos ensaios 2, 4 e 6, o comportamento de hidrólise da lactose e síntese de GOS pela β -galactosidase no leite desnatado, destes ensaios, em intervalos de tempo de 30 minutos até 2 horas de reação, está apresentado na Figura 3.

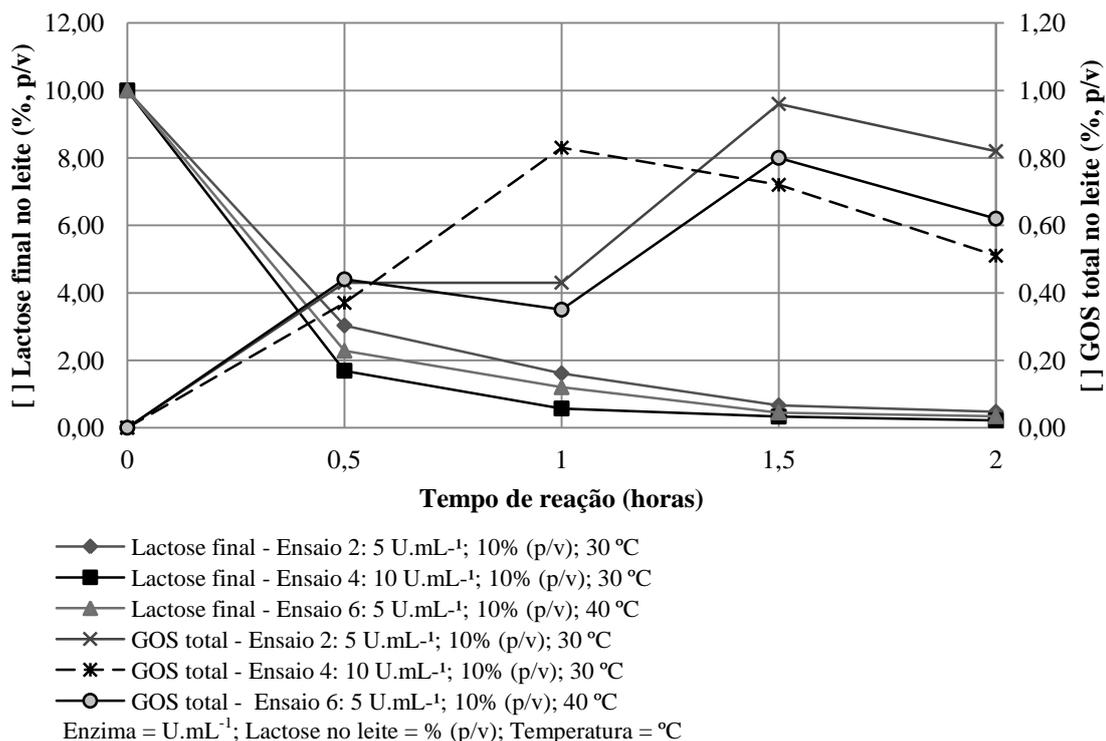
Neste período foi observado que o máximo rendimento total de GOS (10,32%) foi alcançado em 1,5 horas nas condições do ensaio 2, com 93,30% de conversão da lactose, representando uma concentração de GOS total de 0,96% (p/v) no leite desnatado. As condições do ensaio 6 possibilitaram atingir no leite desnatado uma concentração de 0,80% (p/v) de GOS total nesse mesmo período de tempo, a 95,42% de redução da lactose, equivalente a um rendimento de 8,54%. Após 1,5 horas, houve uma tendência de redução na concentração de GOS no leite, indicando a predominância da hidrólise destes compostos pela β -galactosidase (Figura 3).

Com a mesma concentração de lactose no leite dos demais ensaios (10%, p/v), e com uma concentração enzimática maior (10 U.mL⁻¹), a 30 °C, verificou-se que no ensaio 4 a síntese máxima de GOS (0,83%, p/v) ocorreu em um menor tempo (1 hora), com 0,57% (p/v) de lactose presente no leite desnatado (Tabelas 3 e 4, Apêndice A). Após este tempo, observa-se uma redução progressiva da concentração de GOS total no leite (Figura 3).

O rendimento máximo de GOS total alcançado pelo o ensaio 4 (8,78%) foi superior e obtido em um menor tempo comparado ao rendimento do ensaio 6 (8,54%). Isso implica

na influência da concentração enzimática e da temperatura na síntese e decomposição de GOS ao longo do tempo de reação. A temperatura de 40 °C (ensaio 6) pareceu desfavorecer a reação de transgalactosilação tendo em vista o menor rendimento de GOS obtido em relação àquele alcançado a 30 °C.

Figura 3 - Concentrações de lactose e GOS total (% p/v) no leite dos ensaios 2, 4 e 6 nos diferentes tempos de reação (0,5; 1; 1,5; e 2 horas)



Guerrero *et al.* (2015) explicam que a concentração enzimática no leite pode interferir no início e no progresso da hidrólise secundária na mistura reacional. A maior concentração de enzima do ensaio 4 (10 U.mL⁻¹) pareceu favorecer a síntese de GOS em tempos mais reduzidos de reação, ocorrendo, conseqüentemente, a degradação antecipada desses oligômeros pela enzima encontrar maior facilidade de se ligar ao substrato (lactose e GOS) e promover a catálise. Este fato foi observado por González-Delgado *et al.* (2016), os quais apontaram a concentração de β -galactosidase como um fator de forte influência sobre a evolução do GOS ao longo do tempo de reação. Foi percebido que em concentrações menores de enzima foi necessário um tempo mais longo de reação para atingir rendimentos adequados de GOS, enquanto que aumentando a concentração de β -

galactosidase, o rendimento de GOS adequado aparece a tempos de reação progressivamente mais curtos.

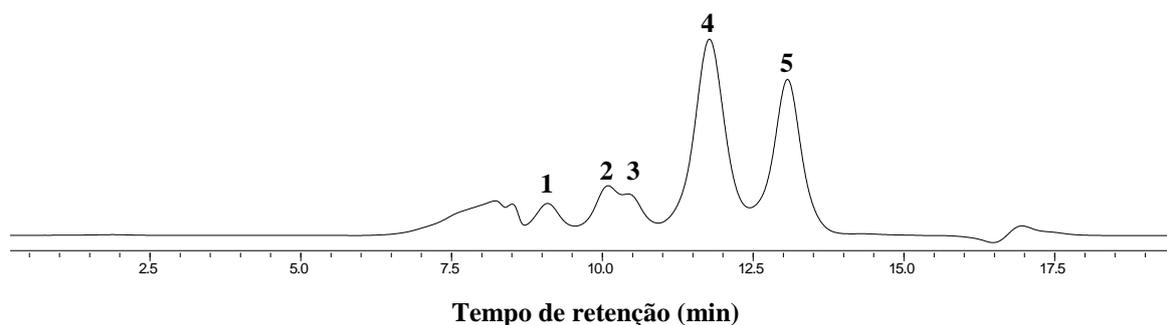
Empregando a enzima Biolactase MB-878 (2740 U.mL^{-1}) de *Bacillus circulans*, a uma concentração de $1,5 \text{ U.mL}^{-1}$ em leite desnatado (4,6%, p/v, de lactose), Rodriguez-Colinas *et al.* (2012) alcançaram como melhor resultado uma concentração total de GOS de 0,71% (p/v) em 2 horas de reação, a $40 \text{ }^\circ\text{C}$. Os resultados obtidos no presente trabalho foram semelhantes, porém com concentrações maiores de lactose (10%, p/v) e de enzima (10 mL^{-1}) no leite desnatado.

Ruiz-Matute *et al.* (2012) analisaram a formação de GOS em leite UHT, a $30 \text{ }^\circ\text{C}$, com a enzima Lactozym Pure (6500 U.mL^{-1}) de *K. lactis*, a uma concentração de $0,3 \text{ U.mL}^{-1}$. Os autores atingiram uma concentração máxima de cerca de 1% (p/v) de GOS total em aproximadamente 5 horas de reação, quando 75 a 90% da lactose no leite foi hidrolisada, ocorrendo, em seguida, uma diminuição gradual para valores abaixo de 0,5% (p/v) de GOS total quando mais de 99% da lactose foi hidrolisada. O presente trabalho, a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ e com 10% (p/v) de lactose no leite desnatado, alcançou uma concentração máxima de GOS total de 0,96% (p/v), suficiente para exercer um efeito benéfico sobre a saúde, segundo os autores citados, com 0,66% (p/v) de lactose residual. Este maior valor residual pode ser decorrente da maior concentração inicial de lactose no leite (10%, p/v).

Rodriguez-Colinas *et al.* (2014) alcançaram uma concentração máxima de 0,7% (p/v) de GOS total em leite desnatado em 1 hora de reação, utilizando enzima de *K. lactis* (Lactozym Pure 6500 L) a $40 \text{ }^\circ\text{C}$, com a concentração de lactose naturalmente presente no leite (4,4-4,6%, p/v). Este trabalho alcançou resultado semelhante de GOS total (0,80%, p/v) em 1,5 horas de reação, com 10% (p/v) de lactose no leite desnatado, também a $40 \text{ }^\circ\text{C}$.

Na análise das amostras para a determinação de GOS, foram identificados 2 tipos de GOS característicos da β -galactosidase de *K. lactis* (Figura 4). A enzima produziu um tipo de trissacarídeo (6'-galactosil-lactose), e um tipo de dissacarídeo (6-galactobiose). Torres *et al.* (2010) tem reportado que esses oligossacarídeos com ligação β -1,6 são característicos de enzimas derivadas de *K. lactis*. Estes tipos de GOS de *K. lactis* também foram reportados por outros autores (PADILLA *et al.*, 2012; RUIZ-MATUTE *et al.*, 2012; RODRIGUEZ-COLINAS *et al.*, 2014; FRENZEL *et al.*, 2015).

Figura 4 – Análise por CLAE-IR da amostra de leite UHT desnatado em 1,5 horas de reação a 30 °C, com concentração enzimática de 5 U.mL⁻¹ e 10% (p/v) de lactose. Os picos correspondem a: (1) 6'-galactosil-lactose, (2) lactose, (3) 6-galactobiose, (4) glicose, e (5) galactose



A partir deste trabalho, foi possível obter um leite UHT desnatado, em pouco tempo de processo (1,5 horas), com uma concentração de GOS total de 0,96% (p/v) e com um baixo teor residual de lactose (0,66%, p/v), empregando uma baixa concentração enzimática (5 U.mL⁻¹), e adicionando lactose ao leite. Este conteúdo de GOS no leite é semelhante ao que ocorre no leite humano, sendo os oligossacarídeos presentes formados basicamente por 6'-galactobiose, allolactose e 6-o-β-galactosil-lactose, numa concentração entre 0,5 e 1,5% (p/v) (RODRIGUEZ-COLINAS *et al.*, 2014).

Torres *et al.* (2010) destacam que leites e fórmulas infantis enriquecidos apenas com GOS ou com FOS podem replicar o efeito bifidogênico reconhecido do leite humano, contribuindo para melhorar a frequência das fezes, diminuir o pH fecal, e estimular o crescimento de bifidobactérias intestinais e de lactobacilos (BEN *et al.*, 2008). Diferentes grupos de pesquisa relataram vários benefícios à saúde que esses carboidratos podem oferecer, de modo que, atualmente, o principalmente foco entre os prebióticos está na sua produção e utilização como componente em alimentos funcionais (SANGWAN *et al.*, 2011).

4 CONCLUSÃO

Neste estudo, a concentração inicial da lactose exerceu maior influência sobre a hidrólise da lactose e a formação de GOS. Em contrapartida, a temperatura foi o parâmetro que exerceu menor influência sobre o processo.

A enzima empregada (5 U.mL^{-1}), derivada de *K. lactis*, mostrou-se eficiente para produzir GOS em leite UHT desnatado com 10% (p/v) de lactose, em pouco tempo de reação (1 a 2 horas), a $30 \text{ }^\circ\text{C}$, possibilitando a obtenção de uma matéria-prima láctea com prebiótico e teor reduzido de lactose. Em um tempo total de 6 horas de reação, todos os ensaios ofereceram condições para elaboração de produtos lácteos capazes de serem consumidos por quem possui deficiência na digestão da lactose.

Os experimentos realizados demonstraram ser possível a obtenção de uma matéria-prima láctea com GOS e teor reduzido de lactose para a elaboração de novos produtos lácteos contendo suas características prebióticas. Produtos assim poderiam oferecer benefícios à saúde da população, especialmente, de pessoas com deficiência na digestão da lactose.

5 REFERÊNCIAS

- ADHIKARI, K. *et al.* Sensory characteristics of commercial lactose-free milks manufactured in the United States. **LWT - Food Science and Technology**, v. 43, p. 113–118, 2010.
- ANSARI, S. A.; HUSAIN, Q. Lactose hydrolysis from milk/whey in batch and continuous processes by concanavalin A-Celite 545 immobilized *Aspergillus oryzae* β galactosidase. **Food and Bioproducts Processing**, v. 90, p. 351-359, 2012.
- BEN, X. M. *et al.* Low level of galacto-oligosaccharide in infant formula stimulates growth of intestinal Bifidobacteria and Lactobacilli. **World Journal of Gastroenterology**, v. 14, n. 42, p. 6564–6568, 2008.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Portaria nº 146 de 07 de março de 1996. Aprova os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade dos Produtos Lácteos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 11 mar. 1996.
- _____. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 135, de 08 de fevereiro de 2017. Altera a Portaria SVS/MS nº 29, de 13 de janeiro de 1998, para regulamentar o parágrafo único do art. 19-A do Decreto-Lei nº 986, de 21 de outubro de 1969, que institui normas básicas sobre alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 09 fev. 2017.
- DAS, B. *et al.* Lactose hydrolysis by β -galactosidase enzyme: optimization using response surface methodology. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 121, p. 244-252, 2015.
- FISCHER, J. *et al.* Optimization and modeling of lactose hydrolysis in a packed bed system using immobilized β -galactosidase from *Aspergillus oryzae*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 85-85, p. 178-186, 2013.
- FISCHER, C.; KLEINSCHMIDT, T. Synthesis of galactooligosaccharides using sweet and acid whey as a substrate. **International Dairy Journal**, v. 48, p. 15-22, 2015.
- FRENZEL, M. *et al.* Comparison of the galacto-oligosaccharide forming activity of different β -galactosidases. **LWT - Food Science and Technology**, v. 60, p. 1068-1071, 2015.
- GÄNZLE, M. G. Enzymatic synthesis of galacto-oligosaccharides and other lactose derivatives (hetero-oligosaccharides) from lactose. **International Dairy Journal**, v. 22, p. 116-122, 2012.
- GONZÁLEZ, R. *et al.* Differential transcriptional response of *Bifidobacterium longum* to human milk, formula milk, and galactooligosaccharide. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, p. 4686-4694, 2008.
- GONZÁLEZ-DELGADO, I. *et al.* Optimisation of the synthesis of high galacto-oligosaccharides (GOS) from lactose with β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. **International Dairy Journal**, v. 61, p. 211-219, 2016.

- GOSLING, A. *et al.* Recent advances refining galactooligo-saccharide production from lactose. **Food Chemistry**, v. 121, n. 2, p. 307-318, 2010.
- GUERRERO, C. *et al.* Purification of highly concentrated galacto-oligosaccharide preparations by selective fermentation with yeasts. **International Dairy Journal**, v. 39, p. 78-88, 2014.
- GUERRERO, C. *et al.* Simultaneous synthesis of mixtures of lactulose and galacto-oligosaccharides and their selective fermentation. **Journal of Biotechnology**, v. 209, p. 31—40, 2015.
- GUERRERO, C.; VERA, C.; ILLANES, A. Optimisation of synthesis of oligosaccharides derived from lactulose (fructosyl-galacto-oligosaccharides) with β -galactosidases of different origin. **Food Chemistry**, v. 138, p. 2225-2232, 2013.
- HSU, C. A.; LEE, S. L.; CHOU, C. C. Enzymatic production of galactooligosaccharides by β -galactosidase from *Bifidobacterium longum* BCRC 15708. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 6, p. 2225-2230, 2007.
- IQBAL, S. *et al.* β -galactosidase from *Lactobacillus plantarum* WCFS1: biochemical characterization and formation of prebiotic galacto-oligosaccharides. **Carbohydrate Research**, v. 345, p. 1408-1416, 2010.
- KHATAMI, S. *et al.* The enzymatic production of lactulose via transglycosylation in conventional and non-conventional media. **International Dairy Journal**, v. 34, p. 74-79, 2014.
- LIMA, A.F. *et al.* Comparative biochemical characterization of soluble and chitosan immobilized β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* NRRL Y1564. **Process Biochemistry**, n. 48, p. 443-452, 2013.
- MARTÍNEZ-VILLALUENGA, C. *et al.* Optimization of conditions for galactooligosaccharide synthesis during lactose hydrolysis by β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* (Lactozym 3000L HP G). **Food Chemistry**, v. 107, p. 258-264, 2008.
- MATEO, C. *et al.* Immobilization of lactase from *Kluyveromyces lactis* greatly reduces the inhibition promoted by glucose: full hydrolysis of lactose in milk. **Biotechnology Progress**, v. 20, p. 1259–1262, 2004.
- PADILLA, B. *et al.* Evaluation of oligosaccharide synthesis from lactose and lactulose using β -galactosidases from *Kluyveromyces* isolated from artisanal cheeses. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 5134–5141, 2012.
- PALAI, T.; BHATTACHARYA, P. K. Kinetics of lactose conversion to galacto-oligosaccharides by β -galactosidase immobilized on PVDF membrane. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 115, n. 8, p. 668-673, 2013.

PALAI, T.; MITRA, S.; BHATTACHARYA, P. K. Kinetics and design relation for enzymatic conversion of lactose into galacto-oligosaccharides using commercial grade β -galactosidase. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 114, n. 4, p. 418-423, 2012.

PALAI, T.; SINGH, A. K.; BHATTACHARYA, P. K. Enzyme, β -galactosidase immobilized on membrane surface for galacto-oligosaccharides formation from lactose: Kinetic study with feed flow under recirculation loop. **Biochemical Engineering Journal**, v. 88, p. 68-76, 2014.

PARK, A. R.; OH, D. K. Effects of galactose and glucose on the hydrolysis reaction of a thermostable β galactosidase from *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 85, p. 1427–1435, 2003.

_____. Galacto-oligosaccharide production using microbial β -galactosidase: current state and perspectives. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 85, p. 1279-1286, 2010.

PESSELA, B. C. C. *et al.* One step purification, covalent immobilization and additional stabilization of a thermophilic poly-his-tagged β galactosidase from *Thermus* sp strain T2 by using novel heterofunctional chelate-epoxy sepabeads. **Biomacromolecules**, v. 4, p. 107–113, 2003.

PURI, M. *et al.* Cell disruption optimisation and covalent immobilisation of β -D-galactosidase from *Kluyveromyces marxianus* YW-1 for lactose hydrolysis in milk. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 160, p. 98–108, 2010.

ROBERFROID, M. Prebiotics: The concept revisited. **Journal of Nutrition**, v. 137, p. 830–837, 2007.

RODRIGUEZ-COLINAS, B. *et al.* Galacto-oligosaccharide Synthesis from Lactose Solution or Skim Milk Using the β -Galactosidase from *Bacillus circulans*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 6391-6398, jun. 2012.

_____. Galactooligosaccharides formation during enzymatic hydrolysis of lactose: Towards a prebiotic-enriched milk. **Food Chemistry**, v. 145, p. 388–394, 2014.

RUIZ-MATUTE, A. I. *et al.* Presence of mono-, di- and galactooligosaccharides in commercial lactose-free UHT dairy products. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 28, p. 164-169, 2012.

SANGWAN, V. *et al.* Galactooligosaccharides: novel components of designer foods. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 4, p. R103–R111, 2011.

SANGWAN, V. *et al.* Galactooligosaccharides reduce infection caused by *Listeria monocytogenes* and modulate IgG and IgA levels in mice. **International Dairy Journal**, v. 41, p. 58-63, 2015.

SEN, P.; BHATTACHARJEE, C.; BHATTACHARYA, P. Experimental studies and two-dimensional modelling of a packed bed bioreactor used for production of galacto-oligosaccharides (GOS) from milk whey. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 39, p. 361-380, 2016.

- SEN, P. *et al.* Process engineering studies of free and micro-encapsulated β -galactosidase in batch and packed bed bioreactors for production of galactooligosaccharides. **Biochemical Engineering Journal**, v. 90, p. 59-72, 2014.
- SHEN, Q. *et al.* Gelatin-templated biomimetic calcification for β -galactosidase immobilization. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 1565–1571, 2011.
- SILVEIRA, M. F. *et al.* Simultaneous Determination of Lactulose and Lactose in Conserved Milk by HPLC-RID. **Journal of Chemistry**, v. 2015, 6 p., 2015.
- TORRES, D. P. M. *et al.* Galacto-oligosaccharides: production, properties, applications, and significance as prebiotics. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 9, p. 438–54, 2010.
- URRUTIA, P. *et al.* Detailed analysis of galactooligosaccharides synthesis with β -galactosidase from *Aspergillus oryzae*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, p. 1081-1087, 2013.
- VÉNICA, C. I. *et al.* Galacto-oligosaccharides formation during manufacture of different varieties of yogurt. Stability through storage. **LWT - Food Science and Technology**, v. 63, p. 198-205, 2015.
- VERA, C. *et al.* Synthesis of galacto-oligosaccharides by β -galactosidase from *Aspergillus oryzae* using partially dissolved and supersaturated solution of lactose. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 50, p. 188-194, 2012.
- VERA, C., GUERRERO, C., ILLANES, A. Determination of the transgalactosylation activity of *Aspergillus oryzae* β -galactosidase: Effect of pH, temperature, and galactose and glucose concentrations. **Carbohydrate Research**, v. 346, p. 745–752, 2011.
- WARMERDAM, A. *et al.* Galacto-oligosaccharide production with immobilized β -galactosidase in a packed-bed reactor vs. free β -galactosidase in a batch reactor. **Food and Bioproducts Processing**, v. 92, p. 383-392, 2014.
- WOOTEN, W. J. Lactose Intolerance and Ethnic Prevalence. In: NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH. **Lactose Intolerance and Health**. Kensington: National Institutes of Health, p. 49-52, 2010.
- ZHOU, H-X. *et al.* β -Galactosidase over-production by a *mig1* mutant of *Kluyveromyces marxianus* KM for efficient hydrolysis of lactose. **Biochemical Engineering Journal**, v. 76, p. 17-24, 2013.

APÊNDICE A

Tabela 1 – Resultados obtidos de Conversão da lactose, 6'-galactosil-lactose e 6-galactobiose no leite em 2, 4 e 6 horas a partir do Planejamento Experimental 2³

Ensaio	Conversão da lactose (%)			6'-galactosil-lactose (%, p/v)			6-galactobiose (%, p/v)		
	2h	4h	6h	2h	4h	6h	2h	4h	6h
1	98,96	99,98	99,98	0,08	0,04	0,03	0,10	0,05	0,05
2	94,28	97,94	98,86	0,35	0,16	0,09	0,45	0,26	0,18
3	99,98	100,00	100,00	0,05	0,01	0,01	0,05	0,01	0,02
4	97,28	99,18	99,51	0,18	0,07	0,04	0,32	0,15	0,11
5	99,75	100,00	100,00	0,03	0,01	0,00	0,08	0,03	0,001
6	96,72	98,88	99,46	0,22	0,08	0,05	0,34	0,18	0,11
7	100,08	99,99	99,98	0,01	0,00	0,00	0,02	0,02	0,02
8	98,93	99,75	99,83	0,06	0,02	0,02	0,20	0,09	0,08
9	98,26	99,51	99,74	0,12	0,05	0,03	0,19	0,10	0,07
10	98,30	99,61	99,84	0,10	0,04	0,02	0,18	0,09	0,06
11	98,40	99,58	99,78	0,11	0,05	0,03	0,19	0,10	0,07

Concentração de lactose = (% p/v)*; Concentração de enzima = (U.mL⁻¹); Temperatura = °C. Ensaio 1 – 5% (p/v), 5 U.mL⁻¹, 30 °C; Ensaio 2 – 10% (p/v), 5 U.mL⁻¹, 30 °C; Ensaio 3 – 5% (p/v), 10 U.mL⁻¹, 30 °C; Ensaio 4 – 10% (p/v), 10 U.mL⁻¹, 30 °C; Ensaio 5 - 5% (p/v), 5 U.mL⁻¹, 40 °C; Ensaio 6 – 10% (p/v), 5 U.mL⁻¹, 40 °C; Ensaio 7 – 5% (p/v), 10 U.mL⁻¹, 40 °C; Ensaio 8 – 10% (p/v), 10 U.mL⁻¹, 40 °C; Ensaio 9 = Ensaio 10 = Ensaio 11 - 7,5% (p/v), 7,5 U.mL⁻¹, 35 °C.

*Concentrações atingidas adicionando a diferença em relação ao teor de lactose do leite

h = horas de reação enzimática

Tabela 2 - Efeito das variáveis independentes (Enzima, Lactose inicial e Temperatura) sobre a conversão da lactose e formação de galacto-oligosacarídeos em 2, 4 e 6 horas

Coeficiente	Conversão da Lactose (%)			6'-galactosil-lactose (%, p/v)			6-galactobiose (%, p/v)		
	2h	4h	6h	2h	4h	6h	2h	4h	6h
B₀	98,27	99,5	99,73	0,12	0,05	0,03	0,19	0,10	0,08
B₁	1,64	0,53	0,25	-0,09	-0,05	-0,02	-0,09	-0,06	-0,03
B₂	-2,89	-1,05	-0,57	0,16	0,07	0,04	0,26	0,14	0,10
B₃	1,24	0,38	0,23	-0,08	-0,04	-0,02	-0,07	-0,04	-0,04
B_{1,2}	0,96	0,52	0,25	-0,07	-0,03	NS	-0,04	-0,04	-0,02
B_{1,3}	-0,37	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	0,02
B_{2,3}	0,8	0,37	0,23	-0,04	-0,02	NS	-0,04	-0,03	NS
R²	0,999	0,989	0,976	0,994	0,996	0,986	0,999	0,998	0,995
R²ajust	0,998	0,973	0,94	0,986	0,989	0,965	0,997	0,996	0,988
Falta de ajuste	p<0,05	p<0,05	p<0,05	P<0,05	P<0,05	P<0,05	P<0,05	P<0,05	P<0,05

1: Enzima (U.mL⁻¹); 2: Lactose inicial (% p/v); 3: Temperatura (°C); NS: não significativo (p>0,05); h = tempo em horas do processo de reação enzimática

Tabela 3 – Resultados obtidos de Conversão da lactose, concentrações de lactose final, glicose e galactose no leite em 0,5, 1, 1,5 e 2 horas em 3 ensaios do Planejamento Experimental 2³

Ensaio	Conversão da lactose (%)				Lactose final (%, p/v)				Glicose (%, p/v)				Galactose (%, p/v)			
	0,5h	1h	1,5h	2h	0,5h	1h	1,5h	2h	0,5h	1h	1,5h	2h	0,5h	1h	1,5h	2h
2	69,39	83,76	93,30	95,22	3,03	1,61	0,66	0,47	3,41	4,08	4,34	4,52	2,04	2,86	3,34	3,73
4	82,94	94,26	96,63	97,74	1,69	0,57	0,33	0,22	4,15	4,54	4,75	4,91	2,51	3,51	4,01	4,42
6	76,97	87,83	95,42	96,59	2,28	1,20	0,45	0,34	3,44	4,04	4,45	4,66	2,16	3,02	3,67	4,04

Concentração de lactose = (% p/v)*; Concentração de enzima = (U.mL⁻¹); Temperatura = °C. Ensaio 2 – 10% (p/v), 5 U.mL⁻¹, 30 °C; Ensaio 4 – 10% (p/v), 10 U.mL⁻¹, 30 °C; Ensaio 6 – 10% (p/v), 5 U.mL⁻¹, 40 °C.

*Concentrações atingidas adicionando a diferença em relação ao teor de lactose do leite

h = horas de reação enzimática

Tabela 4 – Resultados obtidos de concentrações de 6'-galactosil-lactose, 6-galactobiose e GOS total no leite em 0,5, 1, 1,5 e 2 horas nas condições de 3 ensaios do Planejamento Experimental 2³

Ensaio	6'-galactosil-lactose (%, p/v)				6-galactobiose (%, p/v)				GOS total (%, p/v)			
	0,5h	1h	1,5h	2h	0,5h	1h	1,5h	2h	0,5h	1h	1,5h	2h
2	0,43	0,43	0,34	0,28	0,00	0,00	0,62	0,54	0,43	0,43	0,96	0,82
4	0,37	0,28	0,18	0,13	0,00	0,55	0,48	0,38	0,37	0,83	0,72	0,51
6	0,44	0,35	0,26	0,15	0,00	0,00	0,54	0,47	0,44	0,35	0,80	0,62

Concentração de lactose = (% p/v)*; Concentração de enzima = (U.mL⁻¹); Temperatura = °C. Ensaio 2 – 10% (p/v), 5 U.mL⁻¹, 30 °C; Ensaio 4 – 10% (p/v), 10 U.mL⁻¹, 30 °C; Ensaio 6 – 10% (p/v), 5 U.mL⁻¹, 40 °C.

*Concentrações atingidas adicionando a diferença em relação ao teor de lactose do leite

h = horas de reação enzimática