

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

CAMILA REGINA HACKENHAAR

OBTENÇÃO ENZIMÁTICA DE GALACTOOLIGOSSACARIDEOS
UTILIZANDO SORO E PERMEADO DE SORO DE QUEIJO COMO SUBSTRATO

Porto Alegre
Janeiro, 2018

Camila Regina Hackenhaar

OBTENÇÃO ENZIMÁTICA DE GALACTOOLIGOSSACARIDEOS
UTILIZANDO SORO E PERMEADO DE SORO DE QUEIJO COMO SUBSTRATO

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Instituto de Ciência e
Tecnologia de Alimentos da
Universidade Federal do Rio Grande do
Sul como requisito parcial para obtenção
do Título de Engenheiro de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Plinho Francisco Hertz

Porto Alegre
Janeiro, 2018

Ficha Catalográfica

OBTENÇÃO ENZIMÁTICA DE GALACTOOLIGOSSACARIDEOS
UTILIZANDO SORO E PERMEADO DE SORO DE QUEIJO COMO SUBSTRATO

Camila Regina Hackenhaar

Aprovada em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA:

Rafael Costa Rodrigues
Doutor em Engenharia Química
ICTA/UFRGS

Lucas Dal Magro
Mestre em Ciência e Tecnologia
de Alimentos
ICTA/UFRGS

Plinho Francisco Hertz
Doutor em Ciência de Alimentos
ICTA/UFRGS

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador Prof. Plinho Francisco Hertz, pelos ensinamentos, pela dedicação, amizade e principalmente por ter acreditado em mim durante toda a vida acadêmica.

A Prof. Manuela, grande amiga que o laboratório me proporcionou e que se tornou imensamente importante na minha vida. Agradeço pela ajuda, pelas conversas, pela paciência, pelos ensinamentos, pela amizade e por cuidar de mim durante todos esses anos.

Ao pessoal do Laboratório de Enzimologia pela ajuda e paciência ao longo do trabalho, em especial à Luiza e Elí pela amizade, companheirismo e bons momentos que compartilhamos.

A esta Universidade, seus Professores e Funcionários, responsáveis por grande parte do meu aprendizado e pelo ensino de qualidade.

A todos meus amigos, que sempre me apoiaram e compreenderam minhas ausências.

Ao Tadeu, Rejane e Fabiana pela acolhida, compreensão e apoio em todos os momentos.

À minha família, Reneu, Ieda e Fernando, pelo carinho, paciência, por todo amor e apoio nas minhas escolhas.

E por fim, agradeço principalmente ao meu namorado Rafael, que esteve ao meu lado desde o início, pelo carinho, pela amizade, pela paciência e pelo amor incondicional.

RESUMO

A imobilização de enzimas é uma metodologia relativamente simples e oferece muitas vantagens, por exemplo: a reutilização eficiente da enzima, uma operação contínua, maior estabilidade térmica e operacional. As β -galactosidases pertencem ao grupo de enzimas que têm despertado crescente interesse por parte da indústria de alimentos, devido a sua capacidade de hidrolisar a lactose e de produzir galacto-oligossacarídeos (GOS). Os GOS são considerados prebióticos, pois são usados de forma seletiva por bactérias consideradas benéficas (probióticos) em detrimento das bactérias patogênicas, com diversos benefícios à saúde. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi estudar a síntese de GOS utilizando β -galactosidase de *Bacillus circulans* imobilizada em suportes à base de quitosana, e soro e permeado de soro de queijo como substrato para a síntese. Inicialmente foi preparado um suporte à base de quitosana através do método de precipitação, posteriormente ativadas com glutaraldeído. A imobilização da β -galactosidase foi realizada incubando-se, durante 15h, uma solução enzimática com as esferas obtidas. A atividade da β -galactosidase livre e imobilizada foi medida utilizando o substrato cromogênico *o*-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo (ONPG). A síntese de GOS foi estudada com a enzima imobilizada em diferentes condições de pH, temperatura e concentração inicial de lactose e, posteriormente analisada por cromatografia líquida de alta eficiência, para quantificação dos açúcares. A concentração inicial de lactose no meio reacional foi o parâmetro que mais influenciou na síntese de GOS, sendo que a concentração máxima de GOS obtida para o soro foi de 159,4 g/L com rendimento de 40%, e para o permeado 162,9 g/L com 41% de rendimento, ambos utilizando uma solução de 400g/L. A partir destes resultados, pode-se concluir que a β -galactosidase de *Bacillus circulans* imobilizada em quitosana apresentou satisfatório rendimento na síntese de GOS em soro e permeado de soro de queijo. Esses dois produtos enriquecidos com GOS podem ser usados em bebidas lácteas, iogurtes e leite em pó infantil.

Palavras-chave: Galactooligossacarídeos, β -galactosidase, Imobilização, Soro e Permeado de Soro de Queijo, Quitosana.

ABSTRACT

Enzyme immobilization is a relatively simple methodology and offers many advantages, for example: efficient reuse of the enzyme, continuous operation, increased thermal and operational stability. β -galactosidases belong to the group of enzymes that have aroused growing interest in the food industry due to their ability to hydrolyze lactose and produce galactooligosaccharides (GOS). GOS is considered prebiotic because it is used selectively by bacteria considered beneficial (probiotics) to the detriment of pathogenic bacteria, with several health benefits. Thus, the objective of this work was to study the synthesis of GOS using *Bacillus circulans* β -galactosidase immobilized on chitosan-based support and whey and cheese whey permeate as a substrate for the synthesis. Initially a support was prepared based on chitosan through the precipitation method, later activated with glutaraldehyde. Immobilization of β -galactosidase was performed by incubating an enzymatic solution with the spheres for 15h. The activity of free and immobilized β -galactosidase was measured using the chromogenic substrate o-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside (ONPG). The synthesis of GOS was studied with the enzyme immobilized under different conditions of pH, temperature and initial concentration of lactose and later analyzed by high performance liquid chromatography for quantification of sugars. The initial concentration of lactose in the reaction medium was the parameter that most influenced the synthesis of GOS, and the maximum concentration of GOS obtained for the whey was 159.4 g / L with 40% yield, and for the permeate was 162.9 g / L in 41% yield, both using a 400g / L solution. From these results, it can be concluded that β -galactosidase from *Bacillus circulans* immobilized on chitosan presented a satisfactory yield in GOS synthesis in whey and cheese whey permeate. These two products enriched with GOS can be used in dairy drinks, yogurts and infant milk powder.

KEYWORDS: Galactooligosaccharides, β -galactosidase, Immobilization, Whey and Cheese Whey Permeate, Chitosan.

Lista de Figuras

Figura 1: Representação esquemática do processo de produção de oligossacarídeos.....	15
Figura 2: Possíveis modificações da lactose catalisadas pela enzima β -galactosidase.....	16
Figura 3: Diferentes métodos de imobilização enzimática.....	20
Figura 4: Estrutura química da quitosana.	22
Figura 5: Curva padrão lactose	28
Figura 6: Consumo de lactose e síntese de galactooligossacarídeos (GOS) em soro de queijo, em pH 6, 50°C e 400 g/L, por uma β -galactosidase imobilizada em suporte de quitosana.....	31
Figura 7: Consumo de lactose e síntese de galactooligossacarídeos (GOS) em permeado de soro de queijo, em pH 7, 50°C e 400 g/L, por uma β -galactosidase imobilizada em suporte de quitosana	31
Figura 8: Perfil cinético da produção de galactooligossacarídeos (GOS) em soro de queijo a pH 5, em diferentes condições de temperatura e concentração inicial de lactose.....	32
Figura 9: Perfil cinético da produção de galactooligossacarídeos (GOS) em soro de queijo a pH 6, em diferentes condições de temperatura e concentração inicial de lactose.....	32
Figura 10: Perfil cinético da produção de galactooligossacarídeos (GOS) em soro de queijo a pH 7, em diferentes condições de temperatura e concentração inicial de lactose.....	33
Figura 11: Perfil cinético da produção de galactooligossacarídeos (GOS) em permeado de soro de queijo a pH 5, em diferentes condições de temperatura e concentração inicial de lactose.....	33
Figura 12: Perfil cinético da produção de galactooligossacarídeos (GOS) em permeado de soro de queijo a pH 6, em diferentes condições de temperatura e concentração inicial de lactose.....	34
Figura 13: Perfil cinético da produção de galactooligossacarídeos (GOS) em permeado de soro de queijo a pH 7, em diferentes condições de temperatura e concentração inicial de lactose.....	34

Lista de Tabelas

Tabela 1: Composição do soro ácido e doce.	12
Tabela 2: Fontes de β -galactosidase	18
Tabela 3: Classificação materiais para suporte.....	21
Tabela 4: Taxa Recuperação Carboidratos	29
Tabela 5: Consumo de lactose e produção de galactooligossacarídeos (GOS) em soro de queijo, em diferentes condições de catálise, por uma β -galactosidase imobilizada em suporte de quitosana	30
Tabela 6: Consumo de lactose e produção de galactooligossacarídeos (GOS) em permeado de soro de queijo, em diferentes condições de catálise, por uma β -galactosidase imobilizada em suporte de quitosana	30

Sumário

INTRODUÇÃO	11
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
1.1. Soro de Queijo	12
1.2. Permeado de Soro de Queijo.....	13
1.3. Prebióticos.....	14
1.4. Galactooligossacarídeos	16
1.5. Enzima β -galactosidase.....	17
1.6. Imobilização de Enzimas	19
1.7. Suportes para Imobilização de Enzimas	21
2. MATERIAIS E MÉTODOS	23
2.1. Materiais.....	23
2.2. Métodos.....	23
3. RESULTADOS E DISCUSSÕES	28
3.1. Análise de Açúcar Redutor por DNS	28
3.2. Taxa de Recuperação	29
3.3. Síntese de Galactooligossacarídeos	29
4. CONCLUSÕES	37
REFERÊNCIAS	38
ANEXOS	44
ANEXO 1 – Cromatogramas iniciais das soluções de soro de queijo e permeado de soro de queijo a 50°C, 400 g/L e pH 7, respectivamente.	44
ANEXO 2 – Cromatogramas dos maiores rendimentos de síntese de GOS em soro de queijo e permeado de soro de queijo, respectivamente, em pH 7, 400 g/L a 50°C.....	45
ANEXO 3 – Cromatograma GOS commercial – Oligomate 55N.....	46

INTRODUÇÃO

A crescente demanda por alimentos funcionais tem impulsionado o mercado de produtos adicionados de prebióticos, devido às suas importantes propriedades nutricionais e benefícios à saúde, como melhoria da microbiota intestinal e alívio de transtornos gastrointestinais, melhoria na absorção do cálcio da dieta, redução do nível de colesterol sérico, entre outros (GAUR et al., 2005; KLEIN, 2014).

O soro e permeado de soro de queijo são subprodutos da indústria de laticínios que, embora tenham várias utilizações, podem se constituir em um problema ambiental, se descartados inadequadamente no meio ambiente, devido ao grande volume gerado e pela elevada carga orgânica. Por serem ricos em nutrientes, como lactose, proteínas e sais minerais (GABARDO, 2015), apresentam potencial de aproveitamento como substrato em diversos bioprocessos que visam à obtenção de produtos com alto valor agregado, como produção de galactooligossacarídeos (GOS).

Galactooligossacarídeos são compostos por moléculas de galactose ligada à lactose, sendo formados de tri a hexassacarídeos com 2-5 unidades de galactose (SAKO et al., 1999), através da transgalactosilação da galactose por ação da enzima β -galactosidase, a partir de substratos ricos em lactose (MAHONEY, 1998).

Atualmente, os GOS são produzidos comercialmente utilizando a enzima β -galactosidase. No entanto, o custo relativamente alto destas enzimas é um fator limitante a sua aplicação de forma livre, fato este contornado pela técnica de imobilização enzimática, que além de permitir a reutilização do biocatalisador e melhorar sua estabilidade operacional e térmica, permite a utilização de diferentes configurações de reatores para usos em processos contínuos (KLEIN, 2014).

Existem diversos materiais disponíveis para o desenvolvimento de suportes para a imobilização de enzimas, sendo a quitosana de grande interesse por possuir características como biocompatibilidade, propriedades antimicrobianas, fácil preparação em diferentes formas físicas e baixo custo.

Dentro deste contexto, este trabalho tem como objetivo estudar a síntese de GOS utilizando a enzima β -galactosidase imobilizada em suporte de quitosana e aplicada diretamente, no soro e no permeado de soro de queijo.

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. Soro de Queijo

O soro, subproduto do processamento do queijo, é o líquido remanescente, de coloração amarelo-esverdeada devido a presença de riboflavina (vitamina B2), das etapas de precipitação e remoção da caseína do leite (SISO, 1996; DE WITT, 2001; GABARDO, 2015).

Tendo em vista que cerca de 85-95% do volume de leite utilizado na fabricação de queijo resulta em soro, e que retém aproximadamente 55% dos nutrientes existentes no leite, dentre seus principais componentes estão a lactose (4,5-5% m/v), proteínas solúveis (0,6-0,8% m/v), lipídeos (0,4-0,5% m/v) e sais minerais (8-10% de extrato seco), além de vitaminas, aminoácidos e ácidos orgânicos (SISO, 1996; PRAZERES et al., 2012).

Dependendo do tipo de precipitação de caseína utilizada à composição do soro pode variar, onde na elaboração por coagulação ácida em queijos frescos se obtém um soro ácido (pH <5), que devido ao seu sabor azedo e alto teor de minerais tem seu uso limitado pela indústria de alimentos (MAWSON, 1994), diferente do soro doce (pH 6-7) obtido por coagulação enzimática em queijos de massa prensada, que contém maior percentual de lactose, e menor quantidade de ácido láctico e minerais em relação ao soro ácido (MADRID et al., 1995; SISO, 1996; HOMEM, 2004). As principais diferenças quanto à composição dos dois tipos de soro estão na Tabela 1.

Tabela 1: Composição do soro ácido e doce.

Componentes	Soro Ácido (%)	Soro Doce (%)
Água	94-95	93-94
Lactose	3,8-4,2	4,5-5,0
Proteína	0,8-1,0	0,8-1,0
Minerais	0,7-0,8	0,5-0,7
Gordura	0,3-0,6	0,3-0,5
Ácido láctico	0,1-0,8	0,1

Fonte: MADRID et al., 1995.

Para fabricação de um quilograma de queijo necessita-se, em média, de dez litros de leite, sendo gerados nove litros de soro (KOSIKOWSKI, 1979). Devido ao alto teor de matéria orgânica, principalmente a lactose, o grande volume que é gerado, e pelo

tratamento e descarte inadequado do efluente, faz do soro um grande problema ambiental com uma demanda bioquímica de oxigênio (DBO) de 30-50 g/L e demanda química de oxigênio (DQO) de 60-80 g/L (MAWSON, 1994; SISO, 1996), fazendo que esse subproduto seja o maior problema para as indústrias de laticínios (GABARDO, 2011). Fato destacado por Siso (1996), onde o processamento de 100 toneladas de leite para a fabricação de queijo gera a mesma quantidade de matéria orgânica que uma cidade de 55.000 habitantes produz diariamente.

Estima-se que a produção mundial de queijo em 2016 foi de 19,4 milhões de toneladas, o que remete à uma geração de 175 milhões de toneladas de soro (USDA, 2016). No Brasil, segundo estimativas da Associação Brasileira das Indústrias de Queijo (ABIQ), em 2014 foram produzidos 1,10 milhão de toneladas de queijo, correspondendo à produção de 9,9 milhões de toneladas de soro.

Cerca de 50% do soro de queijo produzido no mundo é tratado e utilizado em vários tipos de alimentos, como panificação, biscoitos, chocolate, alimentos proteicos, bebidas lácteas, produtos para alimentação infantil, devido as propriedades físicas benéficas das proteínas que possuem alta capacidade de gelatinização e emulsificação, formulações farmacêuticas, devido as suas propriedades funcionais e bioativas, alimentação animal, além de diversas outras aplicações biotecnológicas (USDEC, 2004; LEITE, 2006; BALDASSO et al., 2011; GABARDO, 2015).

1.2. Permeado de Soro de Queijo

O permeado é um subproduto obtido pelo processo de ultrafiltração, através de membranas, do soro de queijo para produzir concentrado ou isolado proteico de soro. As proteínas do soro ficam retidas, enquanto moléculas menores como lactose, sais minerais e água passam pela membrana filtrante (BARILE et al., 2009).

Na ultrafiltração do soro, as partículas que ficaram retidas geram o concentrado proteico de soro, o qual é utilizado em alimentos funcionais (BALDASSO et al., 2011).

Segundo Silveira et al. (2005), a ultrafiltração do soro de queijo permite a recuperação de proteínas de grande interesse nutricional, no entanto, o permeado continua a ser um importante poluente, pois retém a lactose, que representa mais de 70% do total de sólidos do soro e é grande responsável pelas elevadas cargas de DQO e DBO (GUIMARÃES et al., 2010).

Com os avanços na biotecnologia microbiana a exploração de lactose, tanto no soro como permeado de soro de queijo, como substrato alternativo para processos de biomassa, fermentativos e geração de compostos de interesse, sugere grande potencial de aproveitamento destes subprodutos para a geração de produtos de maior valor agregado (GABARDO et al., 2010).

1.3. Prebióticos

Os prebióticos são moléculas que fornecem nutrientes para as bactérias benéficas do cólon, que não são absorvidos nem hidrolisados pelas enzimas digestivas na parte superior do trato gastrointestinal. Desta forma, prebióticos são ingredientes alimentícios não digeríveis que estimulam seletivamente o crescimento e/ou atividade de bactérias benéficas no cólon, como as bifidobactérias e os lactobacilos, em detrimento da diminuição de bactérias patogênicas como *Clostridium difficile*, conferindo benefícios à saúde do hospedeiro (WANG & GIBSON, 1993; GIBSON & ROBERFROID, 1995). Além do efeito desejável do aumento de bifidobactérias e lactobacilos, ácidos graxos de cadeia curta são produzidos como produtos finais da fermentação com oligossacarídeos, com implicações positivas na prevenção do câncer de cólon (CUMMINGS, 1981).

Segundo Delzenne & Roberfroid (1994), carboidratos não digeríveis incluem diversos compostos como amido resistente, polissacarídeos de parede celular, pectinas, gomas, hemicelulases e oligossacarídeos. No entanto, nem todos são classificados como prebióticos, pois o processo de fermentação no cólon não é específico, uma vez que diferentes espécies de bactérias, incluindo as potencialmente prejudiciais, tem o crescimento e/ou atividade metabólica estimulada (DRASAR et al., 1976; MACZULAK et al., 1993; WANG & GIBSON, 1993).

Os carboidratos não digeríveis que satisfazem os critérios para serem considerados prebióticos são a lactulose e os galactooligossacarídeos (GOS), obtidos a partir da lactose, e os frutooligossacarídeos (FOS), obtidos a partir da sacarose, sendo os dois últimos os ingredientes alimentícios funcionais mais utilizados (GIBSON et al., 2004; MANUCCI, 2009), no entanto existem pesquisas sendo feitas para avaliar o potencial prebiótico de novos oligossacarídeos como lactosacarose, sintetizada a partir de sacarose e lactose por levansacarases, β -galactosidases e β -frutosidases; xilooligossacarídeos obtidos por hidrólise enzimática usando β -xilanasase; glicooligossacarídeos, sintetizados empregando

sacarose mediante glicosiltransferase como alenansacarases ou dextransacarases, entre outros (MANUCCI, 2009; KLEIN, 2014), como mostra Figura 1.

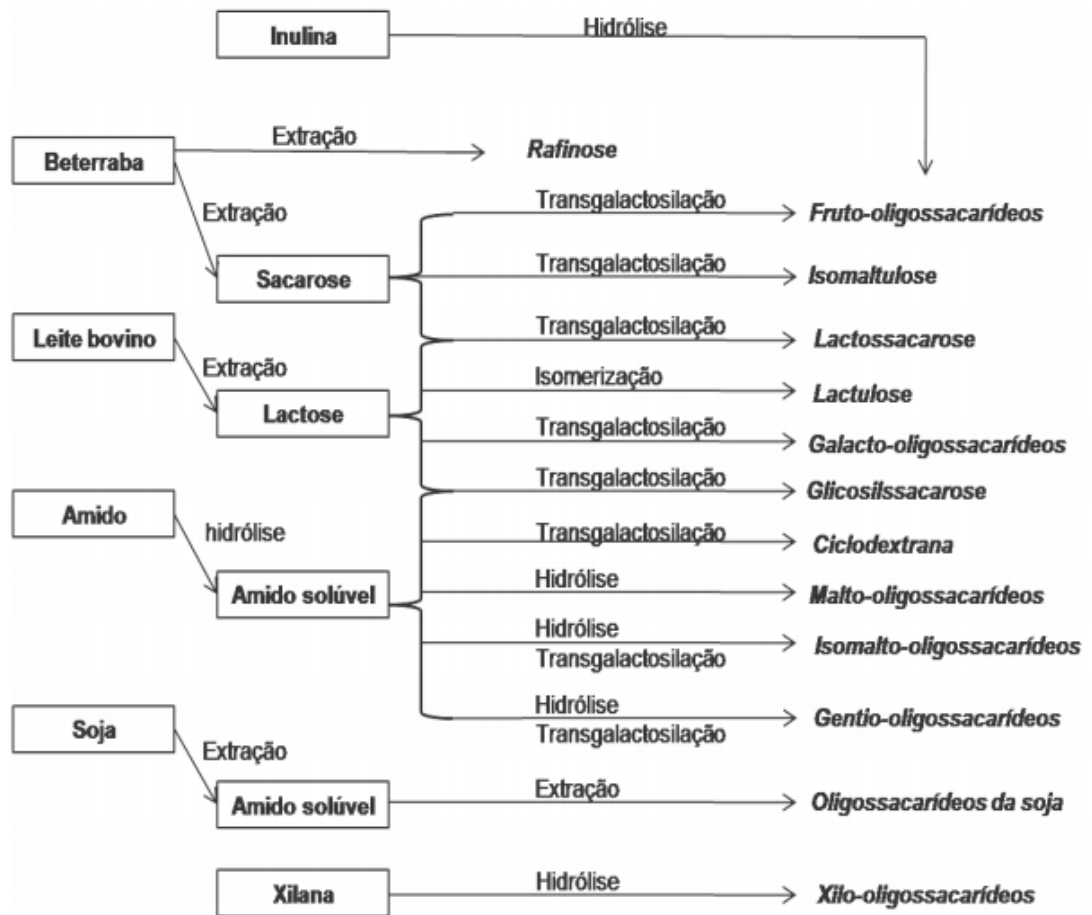


Figura 1: Representação esquemática do processo de produção de oligossacarídeos.

Fonte: FONSECA, 2010.

Muitos estudos, tanto *in vitro* como *in vivo*, têm demonstrado as propriedades benéficas da ingestão de prebióticos (ROBERFROID et al., 2010):

- Aumento da absorção mineral, como cálcio, e melhoria da saúde óssea, pois como estes prebióticos são resistentes à hidrólise por enzimas digestivas do intestino delgado, eles alcançam o cólon praticamente intactos, onde são seletivamente fermentados pela microbiota, a qual produz ácidos graxos de cadeia curta que contribuem para diminuir o pH no intestino grosso, aumentando a biodisponibilidade do cálcio.

- Aumento de bifidobactérias e lactobacilos, o que promove a prevenção da produção de promotores de tumores por bactérias não benéficas, pois o aumento dessas

duas bactérias de ácido láctico no intestino podem diminuir certas enzimas bacterianas envolvidas na síntese ou ativação de compostos cancerígenos e genotóxicos.

- Redução da incidência de dermatites atópicas, possivelmente pelo aumento de bifidobactérias no intestino grosso.

1.4. Galactooligosacarídeos

Galactooligosacarídeos são carboidratos não digeríveis formados por monômeros de galactose e uma unidade terminal de glicose (HERNÁNDEZ et al., 2009).

Os GOS podem ser obtidos por reações de transgalactosilação catalisadas por β -galactosidases de diferentes origens, como fungos, leveduras e bactérias, em meio a soluções concentradas de lactose (KLEIN, 2014).

A Figura 2 apresenta as duas das possíveis modificações da lactose catalisadas pela enzima β -galactosidase.

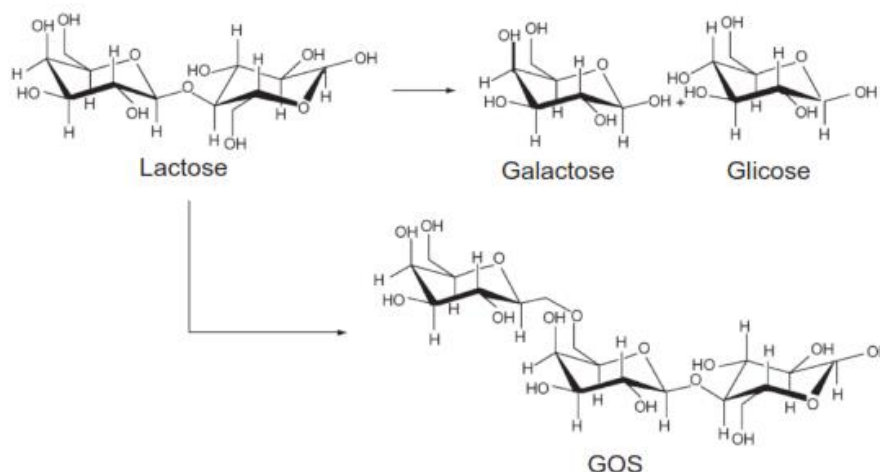


Figura 2: Possíveis modificações da lactose catalisadas pela enzima β -galactosidase.

Fonte: Martins et al., 2009.

O sítio ativo da β -galactosidase possui habilidade tanto para hidrolisar a lactose quanto para transgalactosilar a galactose (JURADO et al., 2002).

A produção de GOS inicia-se com a formação do complexo enzima-galactose, a partir da hidrólise da lactose, e liberação simultânea da glicose. Em seguida, esse complexo é transferido a um aceptor que contém um grupo hidroxila (água ou sacarídeos). Quando em solução com baixa concentração de lactose, a água é mais competitiva como aceptor que outros açúcares, resultando na formação de galactose. Em soluções com

concentrações elevadas de lactose, o sacarídeo atua como acceptor e se liga ao complexo enzima-galactose resultando na formação de GOS de maior peso molecular (ZHOU & CHEN, 2001).

A síntese de GOS a partir da lactose é influenciada por diversos fatores do meio reacional utilizado, como pH, concentração de lactose no meio, temperatura, a fonte da enzima e a concentração da enzima (BOON et al., 2000).

Sob condições ácidas, os GOS são mais estáveis quando submetidos a tratamentos térmicos, quando comparados com os frutooligossacarídeos (FOS) (SAKO et al., 1999), além disso, por não serem digeridos, possuem baixo valor calórico e são não cariogênicos, pois não são metabolizados pela cavidade oral (HARTEMINK et al., 1997). Atualmente há um grande interesse em seu uso em formulações infantis, devido a estrutura similar dos GOS com os oligossacarídeos do leite materno (ANTHONY et al., 2006).

1.5. Enzima β -galactosidase

Enzimas são catalisadores sustentáveis, visto que são biocompatíveis, biodegradáveis, derivadas de fontes renováveis e altamente seletivas. Os processos enzimáticos devem, em geral, ser conduzidos sob condições moderadas de temperatura, pressão atmosférica e pH, pois a exposição em condições extremas pode desnaturar e ocorrer a perda da atividade da enzima, além disso, o uso de enzimas é mais eficiente e gera menos resíduos do que as sínteses orgânicas (SHELDON & VAN PELT, 2013).

A enzima β -galactosidase [lactase; β -D-galactoside galactohidrolase; EC 3.2.1.23] pertence à família das hidrolases e é responsável pela hidrólise do resíduo terminal β -galactopiranosil da lactose, dando origem a uma mistura equimolar de glicose e galactose (GROSOVA et al., 2008; KLEIN, 2014). Esta atividade hidrolítica aumenta a doçura em produtos lácteos, e também diminui a concentração de lactose, que pode ser benéfico para os consumidores intolerantes a lactose (GOSLING et al., 2010).

A β -galactosidase pode ser encontrada em diversas plantas, órgãos de animais e microrganismo tais como fungos filamentosos, bactérias e leveduras (Tabela 2), sendo fungos e leveduras as mais utilizadas para aplicações comerciais (SANTIAGO, 2004).

Tabela 2: Fontes de β -galactosidase

Plantas	Órgãos de animais	Leveduras	Bactérias	Fungos
Pêssego	Intestino	<i>Kluyveromyces lactis</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Aspergillus foetidus</i>
Damasco	Cérebro	<i>Kluyveromyces fragilis</i>	<i>Bacillus megaterium</i>	<i>Aspergillus niger</i>
Amêndoas	Fígado bovino	<i>Candida pseudotropicalis</i>	<i>Thermus aquaticus</i>	<i>Aspergillus flavus</i>
Semente de alfafa		<i>Kluyveromyces marxianus</i>	<i>Streptococcus lactis</i>	<i>Aspergillus oryzae</i>
			<i>S. thermophilus</i>	<i>A. phoenicis</i>
			<i>L. bulgaricus</i>	<i>Mucor pucillus</i>
			<i>L. helarecticus</i>	<i>Mucor meuhei</i>

Fonte: MANUCCI, 2009.

A legislação brasileira, através da Resolução RDC nº53/2014, afirma que a enzima β -galactosidase utilizada na indústria de alimentos, deve ser de origem microbiana, proveniente dos seguintes microrganismos: *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus oryzae* expresso em *Aspergillus niger*, *Candida pseudotropicalis*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces fragilis*, *Kluyveromyces marxianus* e *Saccharomyces sp.* (BRASIL, 2014). Estas espécies são consideradas GRAS (Generally Recognized As Safe) pela FDA (Food na Drug Administration).

A fonte da enzima determina as diferentes propriedades da β -galactosidase, onde por exemplo, β -galactosidase de *A. oryzae* e *B. circulans* possuem alta atividade de transgalactosilação (GUERRERO et al., 2015), enquanto β -galactosidase de *K. lactis* é caracterizada por possuir alta atividade hidrolítica (GEKAS & LOPEZ-LEIVA, 1985). Independentemente da fonte de enzima o teor máximo de GOS de 20% a 40% é geralmente obtido na conversão de lactose superior a 50%. Os maiores rendimentos de GOS (> 50%) são geralmente aqueles que também incluem dissacarídeos (VALERO, 2009).

Neste estudo foi utilizada um preparado comercial líquido, Biolacta, contendo a β -galactosidase de *B. circulans*, de cor castanho escuro, possui glicerol como estabilizante e um pH e temperatura ótimos de atuação de 6 e 45°C, respectivamente.

1.6. Imobilização de Enzimas

Apesar do avanço científico nas áreas da biotecnologia e engenharia de proteína, que viabilizaram a produção de diversas enzimas de forma comercial, a aplicação industrial é dificultada pela baixa estabilidade operacional, difícil recuperação e reutilização da enzima (SHELDON & VAN PELT, 2013). Uma das maneiras de contornar essas desvantagens é através da técnica de imobilização de enzimas (GROSOVA et al., 2008), no qual o biocatalisador pode ser reutilizado diversas vezes, diminuindo seu custo de processo (GENARI et al., 2003).

Desta forma, define-se como enzima imobilizada a “enzima fisicamente confinada ou localizada numa certa região do espaço com retenção de sua atividade catalítica, a qual pode ser usada repetida e continuamente” (CHIBATA, 1978).

Além da facilidade de separação do produto, o que minimiza ou elimina a contaminação do produto final pela enzima, a imobilização enzimática também permite eficiente reuso da enzima, permitindo o uso em operação contínuo em biorreatores, além de maior estabilidade, tanto em condições de armazenamento quanto no operacional, em relação a desnaturação por calor, solventes orgânicos ou autólise (SHELDON & VAN PELT, 2013).

Propriedades da enzima β -galactosidase podem ser afetadas pela imobilização como, estabilidade em temperaturas e pH, parâmetros cinéticos, entre outros (SUN et al., 1999; LADERO et al., 2000). No entanto uma técnica de imobilização adequada pode melhorar as propriedades da β -galactosidase, melhorando sua estabilidade em temperaturas e pH extremos (GROSOVA et al., 2008).

Basicamente os métodos de imobilização de enzimas podem ser divididos em três tipos: Ligação em um suporte, encapsulação e entrecruzamento (Figura 3).

A imobilização da enzima em um suporte pode ser de natureza física (através de interações de Van der Waals ou hidrofóbicas), ligações iônicas ou covalentes (CAO, 2005). No entanto a ligação física é mais fraca, podendo ocorrer a dessorção da enzima do suporte, limitando seu uso, além de ser sensível às condições do ambiente, como temperatura e concentração de íons no meio (GROSOVA et al., 2008). Ligações covalentes evitam que a enzima se desprenda do suporte. Por outro lado, em geral, a ligação covalente tem a desvantagem que caso a enzima perca sua atividade, a enzima e o suporte se tornam inutilizáveis em um novo processo de imobilização (SHELDON & VAN PELT, 2013).

A imobilização covalente de enzimas frequentemente utiliza um agente ativador, como o reagente bifuncional glutaraldeído, em suportes contendo grupamentos amino primários (BETANCOR et al., 2006). As ligações covalentes são as usualmente utilizadas para imobilização de β -galactosidase (GROSOVA et al, 2008).

Os suportes típicos para imobilização enzimática são resinas sintéticas, sólidos inorgânicos como sílica mesoporosa ou zeólitas, ou biopolímeros, como polissacarídeos (SHELDON & VAN PELT, 2013).

A encapsulação ocorre através da inclusão de uma enzima em uma rede polimérica, geralmente matrizes de polímeros orgânicos ou inorgânicos, tais como poliacrilamida e sílica sol-gel, ou um dispositivo de membranas como uma fibra oca ou uma microcápsula (SHELDON & VAN PELT, 2013). A restrição física é, geralmente, muito fraca, entretanto, previne completamente a perda da enzima (KLEIN, 2014).

O entrecruzamento ocorre através de uniões intermoleculares entre enzimas, gerando ligações irreversíveis e agregados com conformação tridimensional. É utilizado para preparar macropartículas livres de suportes, empregando um reagente bifuncional como o glutaraldeído. Este método oferece vantagens como alta concentração de atividade enzimática no biocatalisador, alta estabilidade e baixo custo de produção, devido à exclusão de utilização de suporte (SHELDON, 2007). No caso da imobilização de β -galactosidase, o entrecruzamento é comumente utilizado em combinação com outros métodos, principalmente com adsorção e encapsulação (GROSOVA et al., 2008).

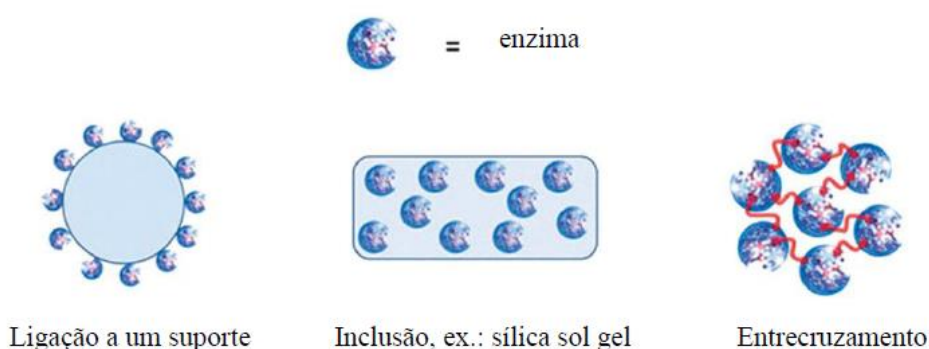


Figura 3: Diferentes métodos de imobilização enzimática

Fonte: SHELDON & VAN PELT, 2013.

1.7. Suportes para Imobilização de Enzimas

Para o bom desempenho da enzima imobilizada, a escolha do suporte é de suma importância, pois ele pode tanto aumentar o tempo de meia-vida da enzima imobilizada, como afetar negativamente não só a estabilidade térmica, mas o desempenho global do sistema (MENDES et al., 2011).

Na escolha de seleção de um suporte, devem ser analisadas algumas características como: área superficial, permeabilidade, insolubidade, capacidade de regeneração, composição, resistência ao ataque microbiológico e mecânico, custo, natureza hidrofílica ou hidrofóbica, dentre outras (MENDES et al., 2011). Os materiais podem ser classificados como orgânicos e inorgânicos, conforme

Tabela 3: Classificação materiais para suporte

Suportes orgânicos	naturais	Polissacarídeos: celulose, ágar, quitina, quitosana, amido, alginatos, etc Proteínas: colágeno, albumina, gelatina, seda, etc
	sintéticos	Poliestireno, poliacrilato, polivinílico, etc
Suportes inorgânicos	minerais	Areia, bentonita, pedra pomes, celite
	manufaturados	Vidro, cerâmica, sílica, aluminossilicatos, óxido de ferro, óxido de níquel, aço inoxidáveis, etc.

Fonte: VIEIRA, 2009.

Dentre os todos os suportes, os mais estudados e utilizados são os derivados de polissacarídeos, como a celulose, quitina e quitosana (KRAJEWSKA, 2004), uma vez

que são seguros do ponto de vista biológico e hidrofílicos, tornando-o adequado para muitas enzimas (KLEIN, 2014).

A quitosana possui diversas características desejáveis para imobilização de enzimas, incluindo: alta afinidade por proteínas, biocompatibilidade, resistência à degradação química, propriedades antimicrobianas e facilidade de preparação em diversos formatos físicos (KRAJEWSKA, 2004; KLEIN, 2014).

Obtida comercialmente a partir da N-desacetilação da quitina, com uma solução de NaOH 40-45% a 100-115°C, seguido de etapas de purificação, a quitosana é obtida, a relativo baixo custo, do exoesqueleto de crustáceos, os quais são resíduos abundantes e rejeitados pela indústria pesqueira (KRAJEWSKA, 2004).

Segundo Krajewska (2004), a preparação de quitosana como suporte pode ser dividida em 4 grupos: evaporação do solvente, neutralização, ligação cruzada e gelificação ionotrópica.

A quitosana é insolúvel em água, mas a presença de grupamentos aminos lhe confere basicidade, e faz com que ela seja solúvel em soluções ácidas, com pH menor que 6,5 e pode ser precipitada em pH alcalino, ocorrendo a gelificação (KRAJEWSKA, 2004), utilizada neste trabalho. A Figura 4 mostra a estrutura química da quitosana.

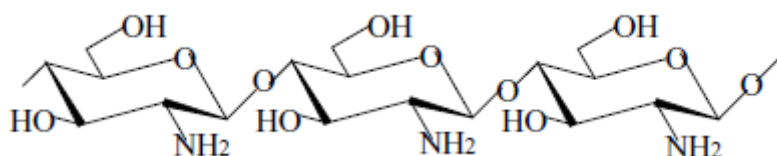


Figura 4: Estrutura química da quitosana.
Fonte: KRAJEWSKA, 2004.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Materiais

A β -galactosidase de *Bacillus circulans* é um preparado comercial, Biolacta, (Espanha, Biocon). A quitosana (de casca de camarão, $\geq 75\%$ desacetilação), o-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo (ONPG) e os açúcares glicose, galactose, lactose, rafinose e estaquiose foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Xarope comercial contendo galactooligossacarídeos com nome de OLIGOMATE 55N, da empresa YAKULT® (Japão). O permeado de soro de queijo em pó foi fornecido pela Sooro (PR, Brasil) e o soro de queijo em pó fornecido pela Elegê Laticínios S.A. (RS, Brasil). Para sua preservação, ambos permaneceram estocados em freezer a $-16\text{ }^{\circ}\text{C}$. Glutaraldeído 25% foi obtido da Nuclear (Brasil). A coluna da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) usada nos testes foi uma Aminex HPX-87C. Os reagentes utilizados no preparo da solução de Carrez I e solução de Carrez II, e todos os outros solventes e produtos químicos foram de grau analítico.

2.2. Métodos

2.2.1. Preparação e Ativação das Partículas de Quitosana

Partículas de quitosana foram preparadas pelo método de precipitação, conforme descrito por Klein et al. (2012). Resumidamente, a quitosana (2% m/v) foi dissolvida em ácido acético (0,35 M) e sonicada durante 20 min para remover as bolhas de ar e então gotejada em uma solução de coagulação de NaOH 1 M e etanol 26% (v/v) sob agitação lenta. As macropartículas obtidas foram lavadas com água destilada até a neutralidade e posteriormente ativadas com glutaraldeído (5% v/v) em tampão fosfato (0,1 M, pH 7) durante 3 horas em temperatura ambiente e agitação lenta. O suporte ativado foi lavado com o mesmo tampão para remover o excesso de glutaraldeído.

2.2.2. Imobilização da Enzima β -Galactosidase

Os suportes obtidos foram incubados com uma solução de β -galactosidase (0,11 mg/ml) preparada em tampão fosfato (0,1 M, pH 6), durante 15 h a temperatura ambiente

(20°C), sob agitação suave (120 rpm). Após a imobilização, foram feitas sucessivas lavagens com tampão fosfato (0,1 M, pH 6) para remover o excesso de enzima até que nenhuma atividade fosse detectada nas frações de lavagem. Entre essas lavagens, o suporte foi lavado com NaCl (1 M) e etilenoglicol (30% v/v) a fim de eliminar as possíveis interações iônicas e hidrofóbicas, respectivamente, entre a enzima e o suporte.

A avaliação do procedimento de imobilização pode ser realizada através do rendimento e eficiência, de acordo com as equações 1 e 2 descritas a seguir (SHELDON & VAN PELT, 2013).

A atividade da enzima imobilizada foi calculada pela diferença entre a atividade inicial e atividade recuperada da solução após a imobilização e nas frações de lavagem do suporte.

$$\text{Rendimento (\%)} = \frac{\text{Atividade imobilizada}}{\text{Atividade inicial}} \times 100 \quad (1)$$

A atividade observada é definida como sendo a atividade da enzima imobilizada.

$$\text{Eficiência (\%)} = \frac{\text{Atividade observada}}{\text{Atividade imobilizada}} \times 100 \quad (2)$$

2.2.3. Atividade da β -galactosidase Livre e Imobilizada

A atividade da β -galactosidase livre e imobilizada foi medida utilizando o substrato cromogênico o-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo (ONPG). A atividade da enzima livre foi realizada incubando a enzima diluída (25 μ L) com 0,5 mL do tampão de atividade (0,1 M, pH 6) contendo ONPG (28 mM) a 40°C durante 2 min. Para a determinação da atividade das enzimas imobilizadas, foram utilizadas 3 esferas de quitosana (aproximadamente 1,5 mg de suporte seco) as quais foram incubadas com 1 mL do tampão de atividade contendo ONPG (28 mM) a 40°C e 2 min. Ambas as reações foram paradas com tampão bicarbonato de sódio (0,1 M, pH 10), sendo o-nitrofenol (ONP) liberado medido em espectrofotômetro a 415 nm. Foi definido que uma unidade de atividade de β -galactosidase (U) é a quantidade de enzima que hidrolisa a conversão de 1 μ mol de ONPG a o-nitrofenol por minuto sob as condições estabelecidas.

2.2.4. Determinação de Açúcares Redutores

A quantificação de lactose foi realizada pelo método de açúcares redutores através do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), proposto por Miller (1959). O procedimento foi realizado da seguinte forma:

- 1 mL da amostra (soro ou permeado) foi adicionado a 1 mL de DNS em tubos de ensaio;
- Incubação a 100°C por 5 min e, em seguida, resfriados em banho de gelo;
- A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro a 540 nm, com uma amostra controle preparada com água destilada, submetida ao mesmo procedimento.

Foi construída uma curva de calibração com diferentes concentrações de soluções de lactose, entre 0,2 e 1,2 mg.mL⁻¹, sendo os valores de absorbância encontrados em cada amostra convertida através da curva padrão.

2.2.5. Síntese Galactooligossacarídeos

A síntese de galactooligossacarídeos com soro e permeado de soro de queijo foi estudada com enzima imobilizada em diferentes concentrações de soro e permeado de soro (30 e 40 % v/v), faixa de pH (5,0, 6,0 e 7,0), e temperaturas (40°C e 50°C). As enzimas imobilizadas foram incubadas com 5 mL de substrato (soro ou permeado de soro) nas condições citadas acima. A cada 30 min foi retirado uma alíquota para obter o perfil completo de reação.

2.2.6. Preparo do permeado e do soro de queijo para análise em HPLC

Para a precipitação das proteínas do soro e permeado de soro, e isolamento dos GOS, utilizou-se as soluções de Carrez I e II preparadas conforme protocolo do Instituto Adolfo Lutz (2008) em “Métodos físicos-químicos para análise de alimentos”, onde para a solução de Carrez I, foi preparada dissolvendo 26,10 g de acetato de zinco em 70 mL de água destilada e 3 mL de ácido acético 0,1M. Sendo posteriormente, transferido a solução para um balão volumétrico de 1 L, e completando o volume com água destilada. Para a solução de Carrez II, dissolveu-se 10,60 g de ferrocianeto de potássio em 50 mL de água destilada, sendo transferido para a solução para um balão volumétrico de 1L, completando o volume com água destilada.

Após a preparação das soluções, adicionou-se 1,8 mL de água destilada, 30 µL da solução de Carrez I e 30 µL da solução de Carrez II a 0,6 mL da alíquota da síntese de GOS. A mistura foi homogeneizada em um agitador de cilindros durante 15 minutos, sendo posteriormente o volume da mistura completado para 3 mL com água destilada. Após, a mistura foi centrifugada a 3000 g por 5 minutos a 5°C. Após a centrifugação, coletou-se 0,6 mL do sobrenadante e repetiu-se a precipitação novamente nas mesmas proporções. Ao final da centrifugação retirou-se uma alíquota de 1 mL do sobrenadante, o qual foi diluído e filtrado em membranas de acetato de celulose de 0,45µm e analisadas para descobrir o teor de açúcares através da cromatografia líquida de alta eficiência (INDYK et al., 1996; MANZI & PIZZOFERRATO, 2011).

2.2.7. Análise de Açúcares por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

Lactose e os produtos da reação de transgalactosilação (GOS, D-galactose e D-glicose) foram analisados em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) (Shimadzu, Tokyo, Japan) equipado com detector de índice de refração (RID) e coluna Aminex HPX-87C (300 mm x 7,8 mm) modo isocrático. Como solvente de eluição foi utilizada água Milli-Q com fluxo de 0,6 mL min⁻¹ e temperatura de forno de 85°C (KLEIN, 2014). A concentração de sacarídeos foi calculada por interpolação de padrões externos, como lactose, glicose e galactose. Conforme Gosling et al. (2011), GOS estão comercialmente disponíveis apenas como misturas, portanto, suas concentrações foram calculadas como equivalentes de rafinose e estaquiose, de um padrão externo de rafinose e estaquiose. O rendimento (%) da síntese de GOS foi definido como a porcentagem de GOS produzida em comparação com o peso inicial de lactose no meio de reação (KLEIN, 2014).

2.2.8. Taxa de Recuperação dos Açúcares

A fim de avaliar a eficiência da metodologia utilizada na precipitação das proteínas, foi realizado um teste de recuperação dos GOS e demais açúcares. Para a análise, foi adicionado nas amostras de soro e permeado, o qual a concentração dos açúcares já havia sido quantificada anteriormente, uma concentração conhecida de GOS

comercial, seguido pelo isolamento e quantificação dos GOS e demais açúcares por HPLC, conforme descrito anteriormente nos itens 2.2.6 e 2.2.7.

A taxa de recuperação dos açúcares foi calculada segundo a Equação 3:

$$\textit{Taxa de Recuperação} = \frac{A-B}{C} \times 100 \quad (3)$$

Sendo,

A = quantidade de analito quantificada no soro e permeado após o teste de recuperação,

B = quantidade de analito presente no soro e permeado, já quantificado anteriormente;

C = quantidade de analito adicionada para o teste de recuperação.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1. Análise de Açúcar Redutor por DNS

No intuito de obter uma prévia da quantidade de lactose presente no soro e no permeado, foi realizado o método de DNS, onde posteriormente as dosagens de lactose, nas mesmas amostras, foram confrontadas com a quantificação através do HPLC, o qual é reconhecido pela acurácia das análises. O teste foi realizado em duplicata com ambos os substratos, numa concentração de 20 g/L de soro e permeado de soro de queijo, onde os valores obtidos com DNS diferiram menos de 8% em relação ao obtido na análise por HPLC.

3.1.1. Curva Analítica Padrão de Lactose

Através da Figura 5, foi obtida a equação $y = ax + b$. Esta equação obtida através da curva analítica experimental foi utilizada para quantificar por interpolação a quantidade de açúcar redutor no soro e permeado de soro.

Sendo:

a e b: valores fornecidos pela equação da reta

y: absorbância da amostra

x: valor da concentração de lactose

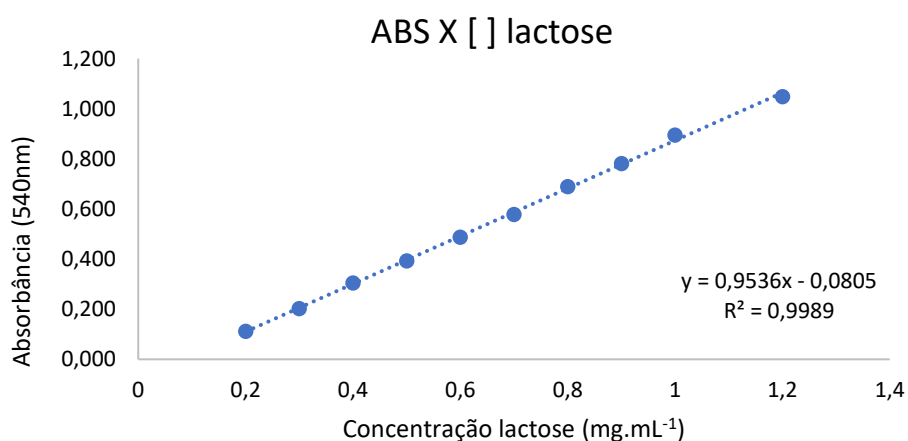


Figura 5: Curva padrão lactose

Por meio da substituição na equação dos valores obtidos na leitura da absorbância, foi verificado que o soro continha 64% de lactose, e o permeado 68% de lactose.

3.2. Taxa de Recuperação

Com o teste foi possível verificar a taxa de recuperação dos açúcares, como mostra a Tabela 4 abaixo. Os resultados indicam que a metodologia utilizada para o preparo das amostras (reagentes de Carrez) é eficiente para a recuperação de açúcares a partir de soro e permeado de soro de queijo.

Tabela 4: Taxa Recuperação Carboidratos

Analito	Taxa Recuperação	Taxa Recuperação
	Soro	Permeado
Lactose	93%	95%
Galactose	96%	98%
Glicose	95%	94%
GOS	98%	95%

3.3. Síntese de Galactooligossacarídeos

As Tabela 5 e Tabela 6 apresentam as diferentes condições de síntese dos 12 ensaios com soro e 12 ensaios com permeado do estudo, onde acompanhou-se o consumo de lactose no tempo necessário para atingir a máxima concentração de GOS. As Figura 6 e Figura 7 apresentam os perfis mais relevantes quanto à produção de GOS, que se destacaram devida a elevada concentração produzida no soro (ensaio 12) e permeado de soro (ensaio 24), respectivamente.

Nos ANEXOS 1, 2 e 3 estão os cromatogramas obtidos das soluções de soro e permeado de soro, mostrando os diferentes açúcares no meio reacional, bem como seus tempos de retenção nas condições de eluição.

Tabela 5: Consumo de lactose e produção de galactooligosacarídeos (GOS) em soro de queijo, em diferentes condições de catálise, por uma β -galactosidase imobilizada em suporte de quitosana

Ensaio	pH, Temperatura, Concentração de lactose	Tempo (min)	GOS (g/L)	Rendimento (%)	Conversão lactose (%)
1	pH 5, 40°C, 300 g/L	240	115,6	39	64
2	pH 5, 40°C, 400 g/L	300	141,8	35	61
3	pH 5, 50°C, 300 g/L	180	105,0	35	67
4	pH 5, 50°C, 400 g/L	240	144,5	36	67
5	pH 6, 40°C, 300 g/L	240	113,4	38	64
6	pH 6, 40°C, 400 g/L	240	150,5	38	62
7	pH 6, 50°C, 300 g/L	240	114,4	38	65
8	pH 6, 50°C, 400 g/L	240	148,2	37	67
9	pH 7, 40°C, 300 g/L	240	115,9	39	65
10	pH 7, 40°C, 400 g/L	300	156,9	39	65
11	pH 7, 50°C, 300 g/L	240	115,7	39	66
12	pH 7, 50°C, 400 g/L	300	159,4	40	64

Tabela 6: Consumo de lactose e produção de galactooligosacarídeos (GOS) em permeado de soro de queijo, em diferentes condições de catálise, por uma β -galactosidase imobilizada em suporte de quitosana

Ensaio	pH, Temperatura, Concentração de lactose	Tempo (min)	GOS (g/L)	Rendimento (%)	Conversão lactose (%)
13	pH 5, 40°C, 300 g/L	240	103,4	34	63
14	pH 5, 40°C, 400 g/L	300	148,7	37	63
15	pH 5, 50°C, 300 g/L	180	107,6	36	67
16	pH 5, 50°C, 400 g/L	240	149,9	37	66
17	pH 6, 40°C, 300 g/L	240	119,9	40	64
18	pH 6, 40°C, 400 g/L	300	156,2	39	63
19	pH 6, 50°C, 300 g/L	240	117,3	39	66
20	pH 6, 50°C, 400 g/L	300	153,8	38	67
21	pH 7, 40°C, 300 g/L	240	112,0	37	64
22	pH 7, 40°C, 400 g/L	300	160,0	40	65
23	pH 7, 50°C, 300 g/L	240	118,1	39	65
24	pH 7, 50°C, 400 g/L	240	162,9	41	64

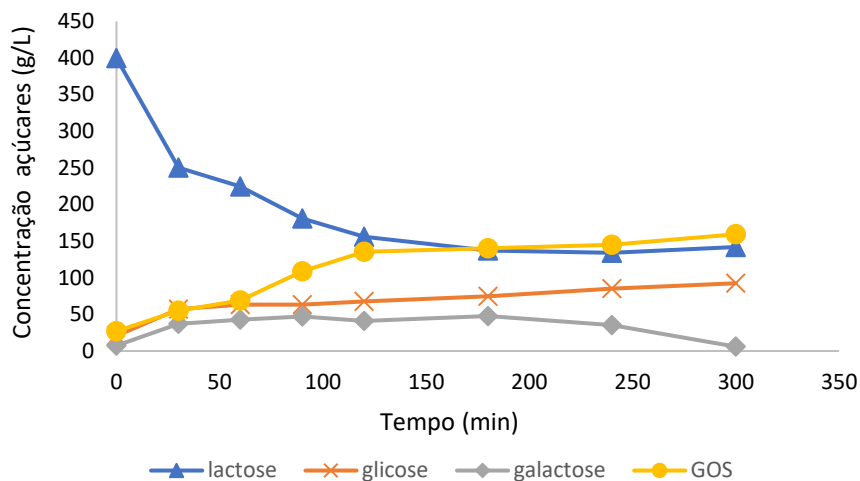


Figura 6: Consumo de lactose e síntese de galactooligossacarídeos (GOS) em soro de queijo, em pH 7, 50°C e 400 g/L, por uma β -galactosidase imobilizada em suporte de quitosana.

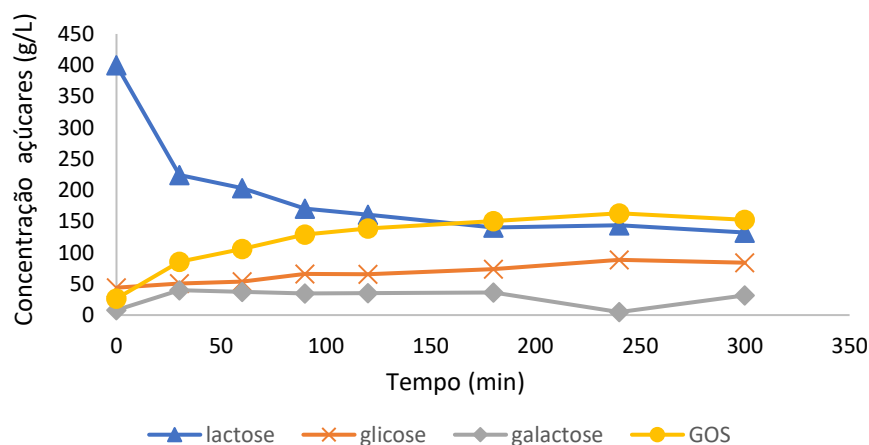


Figura 7: Consumo de lactose e síntese de galactooligossacarídeos (GOS) em permeado de soro de queijo, em pH 7, 50°C e 400 g/L, por uma β -galactosidase imobilizada em suporte de quitosana

3.3.1. Efeito do pH

O efeito do pH na síntese de GOS tanto para o soro como para o permeado de soro foi investigado para valores de pH de 5, 6 e 7, em temperaturas de 40°C e 50°C e concentração de 300 e 400 g/L.

As Figuras 8-13 mostram a reação da síntese de GOS em diferentes pH, para o soro e para o permeado de soro. Geralmente a taxa de reação é afetada pelo pH da solução (SHIN et al., 1998). Para o soro a concentração máxima alcançada de GOS em pH 5

(144,5 g/L em 240 min a 50°C), em pH 6 (150,5 g/L em 240 min a 40°C) e pH 7 (159,4 g/L em 300 min a 50°C). Correspondendo a um rendimento de 36% em pH 5, 38% em pH 6 e 40% em pH 7. Para o permeado a concentração máxima de GOS em pH 5 (149,9 g/L em 240 min a 50 °C), em pH 6 (156,2 g/L em 300 min a 40°C) e pH 7 (162,9 g/L em 240 min a 50°C). Resultando em um rendimento de 38%, 39% e 41%, respectivamente. Conforme mostrado, a produção de GOS foi quase inalterada para a faixa de pH em ambos os substratos. Neri et al. (2009), reportaram resultado similar usando β -galactosidase de *A. oryzae* e faixa de pH 3,5 a 5,5.

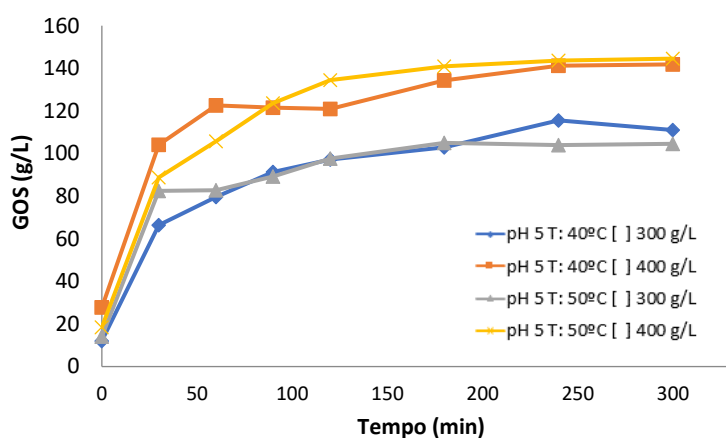


Figura 8: Perfil cinético da produção de galactooligossacarídeos (GOS) em soro de queijo a pH 5, em diferentes condições de temperatura e concentração inicial de lactose.

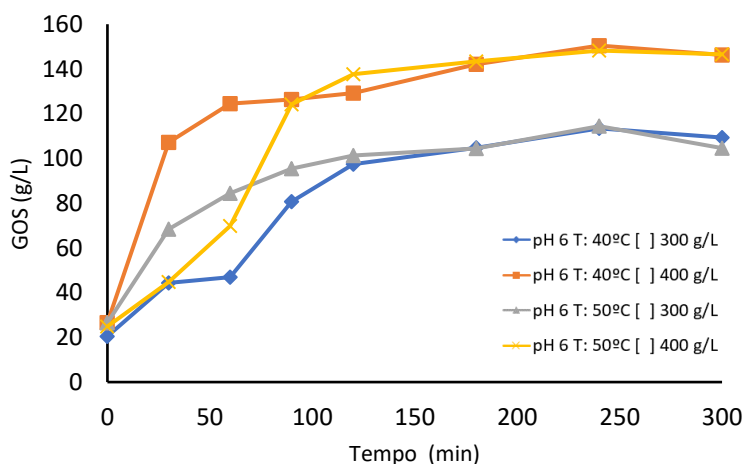


Figura 9: Perfil cinético da produção de galactooligossacarídeos (GOS) em soro de queijo a pH 6, em diferentes condições de temperatura e concentração inicial de lactose.

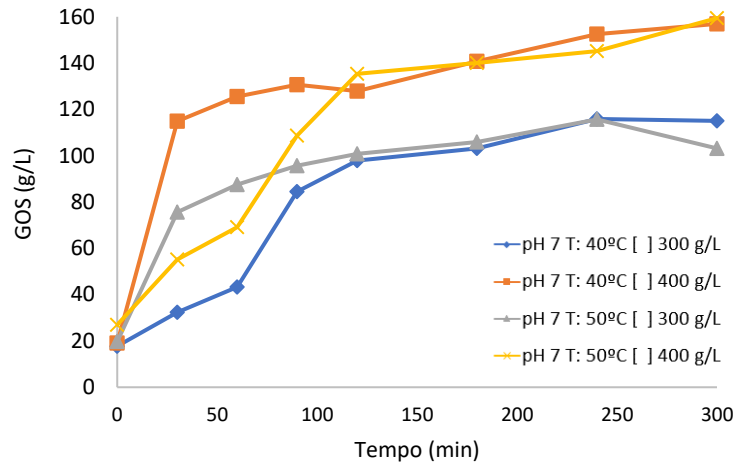


Figura 10: Perfil cinético da produção de galactooligossacarídeos (GOS) em soro de queijo a pH 6, em diferentes condições de temperatura e concentração inicial de lactose.

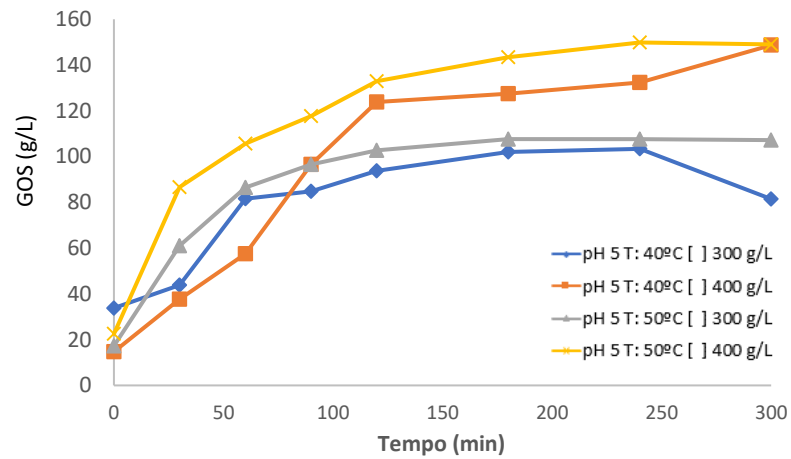


Figura 11: Perfil cinético da produção de galactooligossacarídeos (GOS) em permeado de soro de queijo a pH 5, em diferentes condições de temperatura e concentração inicial de lactose.

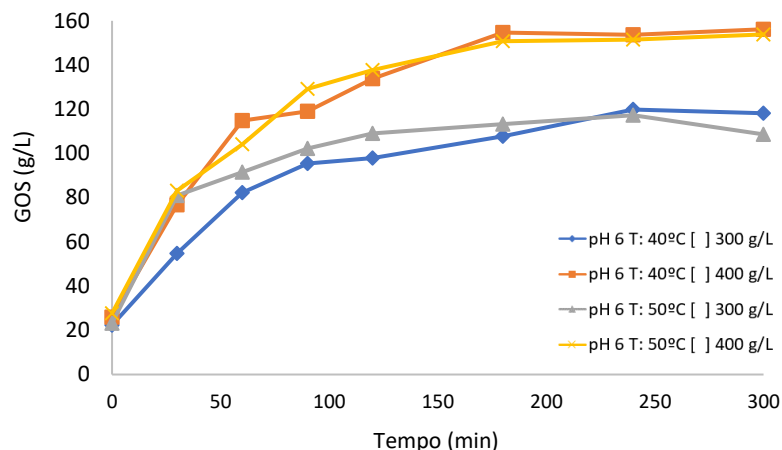


Figura 12: Perfil cinético da produção de galactooligossacarídeos (GOS) em permeado de soro de queijo a pH 6, em diferentes condições de temperatura e concentração inicial de lactose.

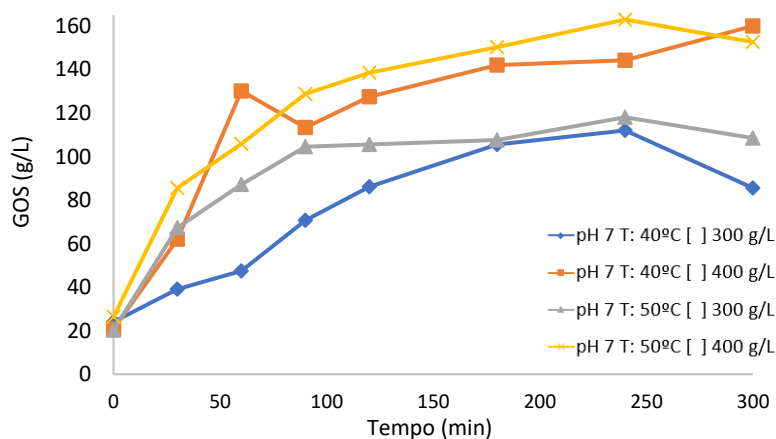


Figura 13: Perfil cinético da produção de galactooligossacarídeos (GOS) em permeado de soro de queijo a pH 7, em diferentes condições de temperatura e concentração inicial de lactose.

3.3.2. Concentração de Lactose

Diversos trabalhos mostram uma correlação entre a transgalactosilação, a fonte da enzima e a concentração inicial de lactose. Segundo Grosova (2008), o fator mais significativo na formação de GOS é a concentração inicial de lactose.

Ainda nos Figuras 8-13, mostram que a síntese de GOS aumenta com o aumento da concentração de lactose. De fato, os grupos β -galactosyl tem uma maior probabilidade de se ligar a lactose do que a água no aumento das concentrações de lactose (KLEIN, 2014). Na síntese de GOS tanto no soro quanto permeado houve um comportamento similar, onde a 40°C e 50°C no pH 5, 6 e 7 com 300 g/L, a produção de GOS cessa quando

a concentração de lactose atinge 105 g/L, enquanto para as mesmas condições citadas anteriormente mas a 400 g/L, a produção de GOS cessa quando a concentração de lactose atinge 140 g/L. Conforme Splechtna et al. (2007) o que pode ser atribuído a uma preferência pela hidrólise ao invés da reação de transgalactosilação. Segundo Cruz et al. (1999) depois de determinada concentração, os GOS são preferencialmente hidrolisados em relação a lactose, pois a enzima β -galactosidase tem maior afinidade por ligações galactose-galactose do que galactose-glicose. Para a concentração de 400 g/L de lactose no soro, a melhor condição de produção de GOS foi 40% (pH 7, 400 g/L, 50°C após 300 min), enquanto para o permeado o rendimento de GOS foi 41% (pH 7, 400 g/L, 50°C após 240 min), no entanto, para ambos substratos em duas horas de reação já havia sido produzido mais de 80% dos GOS.

A influência da concentração é consistente com resultados encontrados na literatura, onde rendimentos de 40% foram encontrados por Valero (2009) na síntese de GOS com 400 g/L de lactose pura utilizando pH 6, 40°C e enzima β -galactosidase de *B. circulans*. A maioria dos trabalhos na literatura aponta para uma produção de GOS entre 20 e 25%, poucos trabalhos apresentam uma síntese com mais de 40% de rendimento (VALERO, 2009).

3.3.3. Efeito da Temperatura

Normalmente a temperatura tem um efeito significativo sobre as taxas de reação enzimática, porém mostrou ter um efeito mínimo sobre o rendimento de GOS. As Figuras 8-13 apresentadas anteriormente, mostram que a elevação de temperatura de 40°C para 50°C, tanto no soro como no permeado de soro, não alterou a maior concentração final de galactooligossacarídeos.

Outros autores reportaram resultados semelhante a este utilizando 400 g/L a 40°C, em termos de rendimento, onde o máximo alcançado foi de 41,3%, correspondendo a uma concentração de 165 g/L, com conversão de 70% de lactose, no entanto o estudo foi realizado em 77,5 h, utilizando enzima β -galactosidase de *B. circulans* e lactose pura como substrato (RODRIGUEZ-COLINAS et al., 2012). Albayrak & Yang (2002) também relataram pouco efeito na produção de GOS por *A. oryzae* em diferentes temperaturas. Embora a preparação enzimática em presença de lactose promova a estabilidade térmica da enzima, em tempos de reação longos a temperatura elevada pode

desfavorecer a reação enzimática, pois a taxa de desnaturação torna-se mais pronunciada (SANTOS et al., 2009).

4. CONCLUSÕES

Este trabalho teve como objetivo estudar a síntese de GOS utilizando a enzima β -galactosidase imobilizada em suportes de quitosana e aplicada diretamente no soro e no permeado de soro de queijo.

A partir do estudo de trabalhos anteriores, foram avaliadas diferentes condições de catálise, concentração de lactose presente no soro e no permeado de soro, temperatura e pH, e seus efeitos na produção de GOS. O soro e permeado de soro são subprodutos da indústria de laticínios com grande potencial para ser utilizado como substrato, mostrando-se uma opção atrativa de custo menor que a lactose em sua forma pura, e uma alternativa para redução da poluição causada pelos mesmos nos efluentes. Com base nos resultados obtidos durante os ensaios, verificou-se que o principal fator que afetou a formação foi a concentração de lactose presente no meio reacional, onde para o soro a máxima produção de GOS ocorreu em pH 7 a 50°C e 400g/L com rendimento de 40% e conversão de lactose de 64%, e para o permeado de soro a máxima produção ocorreu nas mesmas condições que o soro, com rendimento de 41% e conversão de lactose de 64%, enquanto o efeito do pH e temperatura foi pouco significativo. O sucesso na produção de GOS nos dois subprodutos, permite pensar em perspectivas de uso direto do permeado e soro como ingredientes ou como material de partida para a obtenção de oligossacarídeos funcionais com maior grau de purificação.

Como perspectivas futuras deste trabalho:

- Imobilizar a enzimas em suporte de quitosana, porém utilizar genipina como agente de entrecruzamento, devido ao fato de ser menos citotóxica que o glutaraldeído;
- Testar estabilidade térmica e operacional;
- Utilização de biorreatores em processo contínuo;
- Possibilidade de secagem, spray dryer ou liofilização do produto;
- Utilização no desenvolvimento de produtos lácteos (leites fermentados, sorvetes, leite em pó infantil), iogurtes simbióticos, sucos e adoçantes.

REFERÊNCIAS

- ABIQ – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE QUEIJOS. Disponível em: < <http://www.abiq.com.br/> > . Acesso em: 10 set. 2017.
- ALBAYRAK, N.; YANG, S.T. Production of galacto-oligosaccharides from lactose by *Aspergillus oryzae* β -galactosidase immobilized on cotton cloth. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 77, p.8-19, 2002.
- ANTHONY, J. C.; MERRIMAN, T. N.; HEIMBACH, J. T. 90-Day oral (gavage) study in rats with galactooligosaccharides syrup. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 44, p. 819-826, 2006.
- BALDASSO, C., BARROS, T.C., TESSARO, I.C. Concentration and purification of whey proteins by ultrafiltration. **Desalination**, v. 278, p. 381-386, 2011.
- BARILE, D.; TAO, N.; LEBRILLA, C. B.; COISSON, J. D.; ARLORIO, M.; GERMAN, J. B. Permeate from cheese whey ultrafiltration is a source of milk oligosaccharides. **International Dairy Journal**, v. 19, p. 524-530, 2009.
- BETANCOR, L., LÓPEZ-GALLEGO, F., HIDALGO, A., ALONSO-MORALES, N., DELLAMORA-ORTIZ, G., MATEO, C., FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R., GUISÁN, J.M. Different mechanisms of protein immobilization on glutaraldehyde activated supports: Effect of support activation and immobilization conditions. **Enzyme Microb. Technol.** v. 39, p. 877-882, 2006.
- BOON M.A.; JANSSEN A.E.M.; VAN RIET, T.K. Effect of temperature and enzyme origin on the enzymatic synthesis of oligosaccharides. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, p. 271-281, 2000.
- BRASIL, Resolução RDC nº 53. Enzimas, aditivos alimentares e veículos autorizados em preparações enzimáticas para uso na produção de alimentos em geral. **Brasília, D.O.U.** nº194, 2014.
- CAO, L.. **Carrier-bound Immobilized Enzymes. Principles, Applications and Design.** 1º ed. Wiley-VHC: The Netherlands, 2005.
- CHIBATA, I. **Immobilised Enzymes-Research and Development.** John Wiley and Sons, Inc., New York, 1978.
- CRUZ, R.; CRUZ, V. D.; BELOTE, J. G.; KHENAYFES, M.O.; DORTA, C.; OLIVEIRA, L. H. S.; ARDILES, E.; GALLI, A. Production of transgalactosylated oligosaccharides (TOS) by galactosyltransferase activity from *Penicillium simplicissimum*. **Bioresource Technology**, v. 70, p. 165-171, 1999.
- CUMMINGS, J. H. Short chain fatty acids in the human colon. **Gut**, v. 22, p.763-779, 1981.

DELZENNE, N. M., ROBERFROID, M. R. Physiological effects of non-digestible oligosaccharides. **Food Science and Technology-Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie**, v. 27, p. 1-6, 1994.

DE WITT, J.N. **Lecturer's Handbook on Whey and Whey Products**, ed. 1. Bélgica: European Whey Products Association, 2001. 91 p.

DRASAR, B. S.; JENKIS, D. J. A.; CUMMINGS, J. H. Influence of a diet rich in wheat fiber on human fecal flora. **Journal of Medical Microbiology**, v. 9, p. 423-431, 1976.

FONSECA, R.A.S. **Galactooligosacarídeos obtidos enzimaticamente no desenvolvimento de bebidas lácteas com potencial simbiótico**. 2010. 161 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande. 2010.

GABARDO, S. **Otimização da bioconversão de lactose do soro de queijo em etanol em sistemas de biorreatores imobilizados**. 2011. 83 f. Dissertação (Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2011.

GABARDO, S. **Engenharia de biorreatores contínuos com células imobilizadas para a bioconversão de soro e permeado de soro de queijo à bioetanol**. 2015. 197 f. Tese (Doutorado no Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química) - Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2015.

GABARDO, S.; HERTZ, P.F.; AYUB, M.A.Z.; MACIEL, F.L. Aproveitamento biotecnológico de soro de queijo para a produção de goma xantana. **Anais do 2º Congresso Internacional de Tecnologias para o Meio Ambiente**, 8 p., 2010.

GAUR, R., PANT, H., JAIN, R., KHARE, S. K. Galacto-oligosaccharide synthesis by immobilized *Aspergillus oryzae* β -galactosidase. **Food Chemistry**, v.97 , p.426-430, 2005.

GEKAS, V.; LOPEZLEIVA, M. Hydrolysis of Lactose - A Literature-Review. **Process Biochemistry**, v. 20, p.2-12, 1985.

GENARI, A.N.; PASSOS, F.V.; PASSOS, F.M.L. Configuration of bioreactor for milk lactose hydrolysis. **Journal of Dairy Science**, v. 86, p.2783–2789, 2003.

GIBSON, G. R.; ROBERFROID, M. B. Dietary modulation of the human colonic microbiota – Introducing the concept of prebiotics. **Journal of Nutrition**, v. 17, p. 259-275, 1995.

GIBSON, G.R.; PROBERT, H.M.; LOO, J.V.; RASTALL, R.A.; ROBERFROID, M.B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. **Nutrition Research Reviews**, v. 17, p.259-275, 2004.

GUERRERO, C.; VERA, C.; CONEJEROS, R.; ILLANES, A. Transgalactosylation and hydrolytic activities of commercial preparations of beta-galactosidase for the synthesis of prebiotic carbohydrates. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 70, p. 9-17, 2015.

GUIMARÃES, P.M.R.; TEIXEIRA, J.A.; DOMINGUES, L. Fermentation of lactose to bio-ethanol by yeasts as part of integrated solutions for the valorisation of cheese whey. **Biotechnology Advances**, v. 28, p. 375-384, 2010.

GOSLING, A.; STEVENS, G.W.; BARBER, A.R.; KENTISH, S.E.; GRAS, S.L. Recent advances refining galactooligosaccharide production from lactose. **Food Chemistry**, v. 121, p.307-318, 2010.

GROSOVA, Z., ROSENBERG, M., REBROS, M. Perspectives and applications of immobilised beta-galactosidase in food industry - a review. **Czech Journal of Food Sciences**, v. 26, p. 1-14, 2008.

HARTEMINK, R.; VAN LAERE, K. M. J.; PEETERS, C. C. K. M.; NOUT, M. J. R.; ROMBOUTS, F. M. In vitro cariogenicity of transgalactosyl-oligosaccharides. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 25, p. 38-42, 1997.

HERNANDEZ, O.; RUIZ-MATUTE, A.I.; OLANO, A.; MORENO, F.J.; SANZ, M.L.; Comparison of fractionation techniques to obtain prebiotic galactooligosaccharides. **International Dairy Journal**, v. 19, p.531-536, 2009.

HOMEM, G. R. **Avaliação técnico-econômica e análise locacional de unidade processadora de soro de queijo em Minas Gerais**. 2004. 230 p. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa. Viçosa. 2004.

INDYK, H.E.; EDWARDS, M.J.; WOOLARD, D.C. High performance liquid chromatographic analysis of lactose-hydrolysed milk. **Food Chemistry**, v. 57, p. 575-580, 1996.

JURADO, E.; CAMACHO, F.; LUZÓN, G.; VICARIA, J. M. A new kinetic model proposed for enzymatic hydrolysis of lactose by a β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. **Enzyme and Microbial Technology**, Amsterdam, v. 31, p. 300-309, 2002.

KLEIN, M.P. **Hidrólise da lactose e síntese de galactooligossacarídeos utilizando β -galactosidase imobilizada em suportes à base de quitosana**. 2014. 174 p. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina. Santa Catarina. 2014.

KLEIN, M.P.; NUNES, M.R.; RODRIGUES, R.C.; BENVENUTTI, E.V.; COSTA, T.M.H.; HERTZ, P.F.; NINOW, J.L. Effect of the support size on the properties of β -galactosidase immobilized on chitosan: Advantages and disadvantages of macro and nanoparticles. **Biomacromolecules**, v. 13, p. 2456–2464, 2012.

KOSIKOWSKI, F. V. Whey utilization and whey products. **Journal Dairy Science**, v. 62, p. 1149-1160, 1979.

KRAJEWSKA, B. Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 35, p.126-139, 2004.

LADERO, M.; SANTOS, A.; GARCIA-OCHOA, F. Kinetic modeling of lactose hydrolysis with an immobilized β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, p.583-592, 2000.

LEITE, M. T. **Otimização da produção do ácido láctico através da fermentação do soro de queijo por *Lactobacillus helveticus***. 2006. 94 f. Tese (Doutorado no Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia. 2006.

MACZULAK, A. E.; WOLIN, M. J.; MILLER, T. L. Amounts of viable anaerobes, methanogens and bacterial fermentation products in feces of rats fed high-fiber or fiber-free diets. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, p. 657-662, 1993.

MADRID, A.; CENZANO, I.; VICENTE, J.M. **Manual de Indústrias dos Alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, p. 147-168, 1995.

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

MANUCCI F. **Enzymatic synthesis of galactooligosaccharides from whey permeate**. 2009. 183 p. Tese - School of Food Science & Environmental Health, Dublin Institute of Technology. 2009

MANZI, P.; PIZZOFERRATO, L. HPLC Determination of Lactulose in Heat Treated Milk. **Food and Bioprocess Technology**, v. 6, p. 851–857, 2011.

MAWSON, A. J. Bioconversions for whey utilization and waste abatement. **Bioresource Technology**, v. 47, p.195-203, 1994.

MENDES, A.A.; OLIVEIRA, P.C.; CASTRO, H.F. Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial. **Quim. Nova**, v. 34, p.831-840, 2011.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426-428, 1959.

NERI, D.F.M., BALCÃO, V.M., COSTA, R.S., ROCHA, I.C.A.P., FERREIRA, E.M.F.C., TORRES, D.P.M., RODRIGUES, L.R.M., CARVALHO, L.B., TEIXEIRA, J.A. Galactooligosaccharides production during lactose hydrolysis by free *Aspergillus oryzae* β -galactosidase and immobilized on magnetic polysiloxane-polyvinyl alcohol. **Food Chemistry**, v. 115, p.92-99, 2009.

PRAZERES, A. R.; CARVALHO, F.; RIVAS, J. Cheese whey management: A review. **Journal of Environmental Management**, v. 110, p. 48-68, 2012.

ROBERFROID, M., GIBSON, G.R., HOYLES, L., McCARTNEY, A.L., RASTALL, R., ROWLAND, I., WOLVERS, D., WATZL, B., SZAJEWSKA, H., STAHL, B., GUARNER, F., RESPONDEK, F., WHELAN, K., COXAM, V., DAVICCO, M.-J.,

LEOTOING, L., WITTRANT, Y., DELZENNE, N.M., CANI, P.D., NEYRINCK, A.M., MEHEUST, A. Prebiotic effects: metabolic and health benefits. **British Journal of Nutrition**, v. 104, p. S1-S63, 2010.

RODRIGUEZ-COLINAS, B.; POVEDA, A.; JIMENEZ-BARBEDO, J.; BALLESTEROS, A.O.; PLOU, F.J. 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.

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

SANTIAGO, P.A.; MARQUEZ, L.D.S.; CARDOSO, V.L.; RIBEIRO, E.J. Estudo da produção de β -galactosidase por fermentação de soro de queijo com *Kluyveromyces marxianus*. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 24, p.567-572, 2004.

SANTOS, R.; SIMIQUELI, A. P. R.; PASTORE, G. M. Produção de galactooligosacarídeo por *Scopolariopsis* sp. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, p. 682–689, 2009.

SHELDON, R.A. Enzyme immobilization: The quest for optimum performance. **Adv. Synth. Catal.** v. 349, p.1289-1307, 2007.

SHELDON, R.A.; VAN PELT, S. Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. **Chemical Society Reviews**, v. 42, p.6223-6235, 2013.

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

SILVEIRA, W.B; PASSOS, F.J.; MANTOVANI, H.C.; PASSOS, F.M. Ethanol production from cheese whey permeate by *Kluyveromyces marxianus* UFV-3: a flux of oxido-reductive metabolism as a function of lactose and oxygen level. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 46, p. 141-209, 2005.

SISO, M. I. G. The biotechnological utilization of cheese whey: a review. **Bioresource Technology**, v. 57, p. 1-11, 1996.

SPLECHTNA, B.; NGUYEN, T. H.; HALTRICH, D. Comparison between discontinuous and continuous lactose conversion processes for the production of prebiotic galacto-oligosaccharides using β -galactosidase from *Lactobacillus reuteri*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 55, p. 6772-6777, 2007.

SUN, S.; LI, X.; NU, S.; XIN, Y. Immobilization and characterization of β -galactosidase from the plant gram chicken bean (*Cicer arietinum*). Evolution of its enzymatic actions in the hydrolysis of lactose. **J. Agric. Food Chem.**, v. 47, p.819-823, 1999.

USDA – UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. **Dairy: World Markets and Trade.** Disponível em: <<https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/dairy.pdf>>. Acesso em: 10 set. 2017.

USDEC – UNITED STATES DAIRY EXPORT COUNCIL. **Reference Manual for U. S. Whey and Lactose Products.** Arlington, VA, 2004.

VALERO, J. I. S. **Production of galacto-oligosaccharides from lactose by immobilized β -galactosidase and posterior chromatographic separation.** 2009. 270 f. Tese – The Ohio State University, 2009.

VIEIA, D.C. **Imobilização da enzima β -galactosidase de *Kluyveromyces fragilis* em agarose e quitosana utilizando diferentes protocolos de ativação.** 2009. 115 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2009.

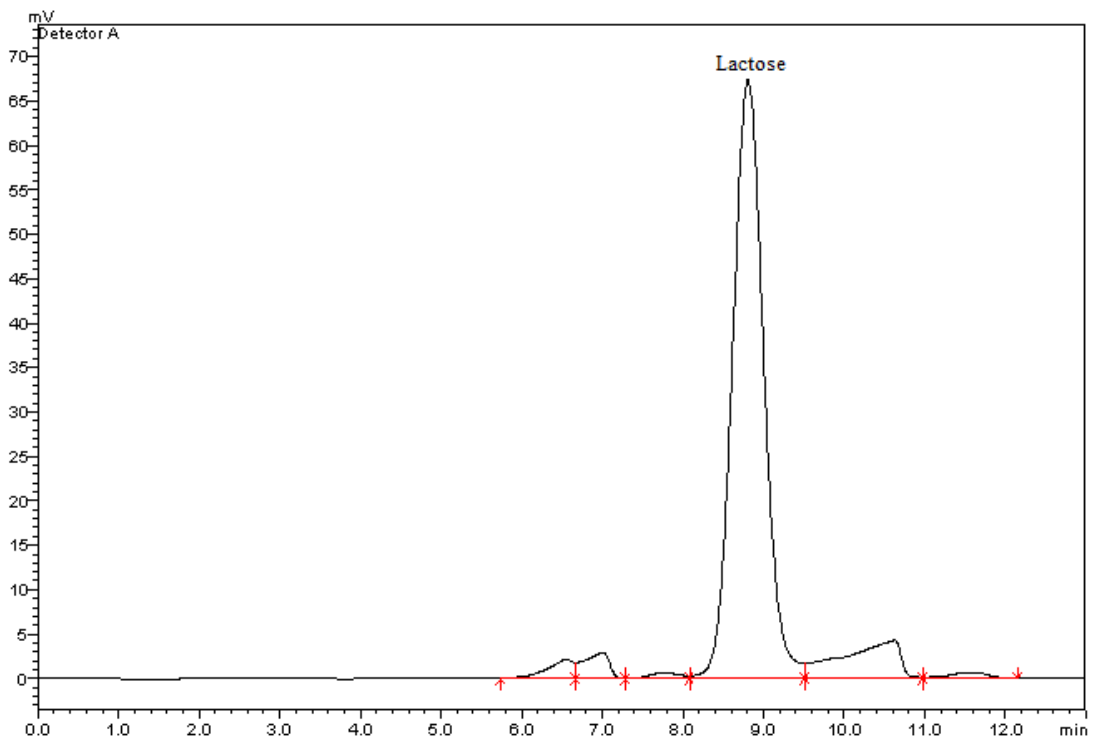
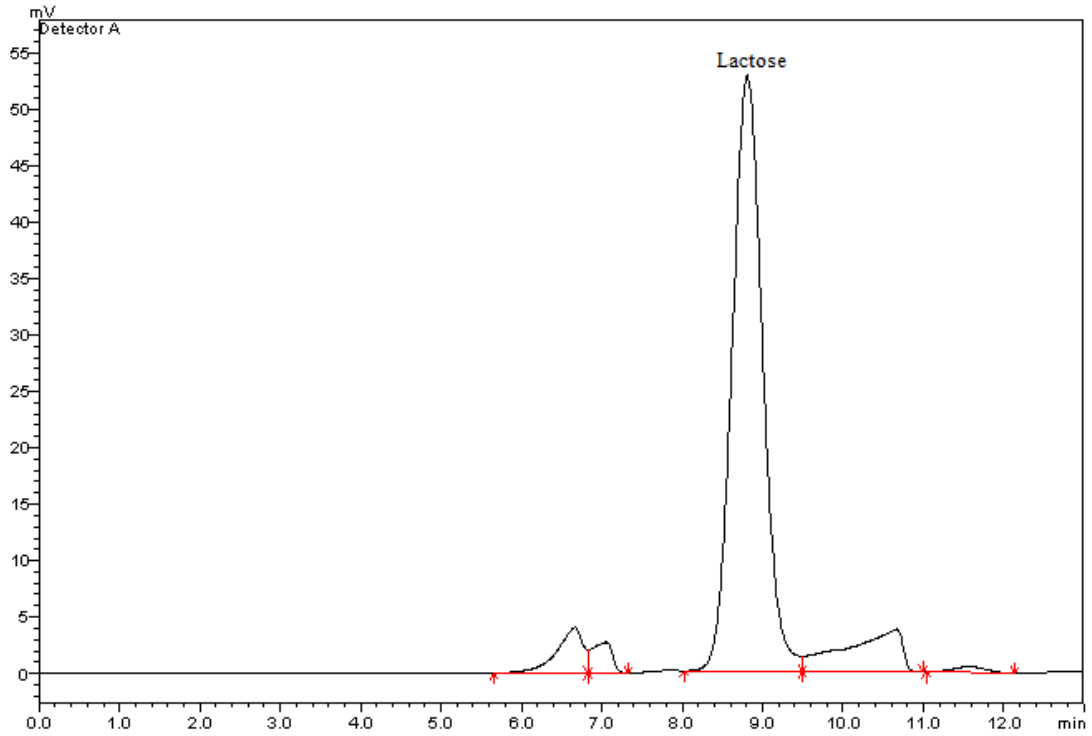
WANG, X.; GIBSON, G. R. Effects of the *in vitro* fermentation of oligofructose and inulin by bacteria growing in the human large intestine. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 75, p. 373-380, 1993.

ZHOU, Q.Z.K.; CHEN, X.D. Immobilization of beta-galactosidase on grafite surface by glutaraldehyde. **Journal of Food Engineering**, v. 48, p. 69-74, 2001.

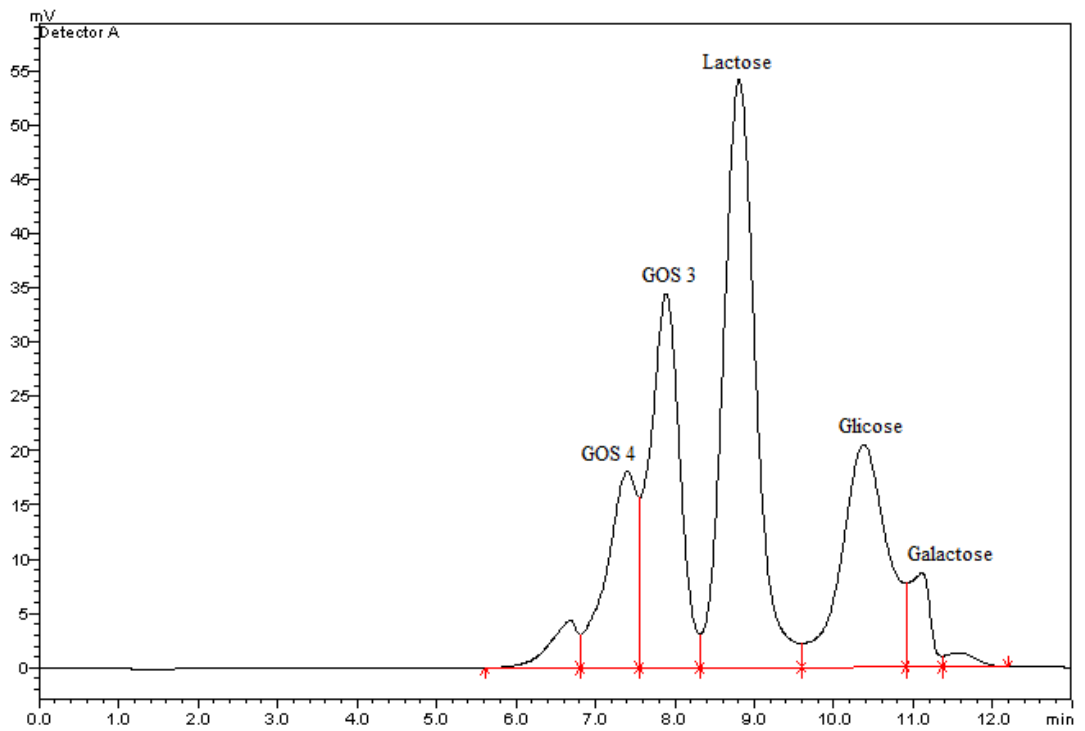
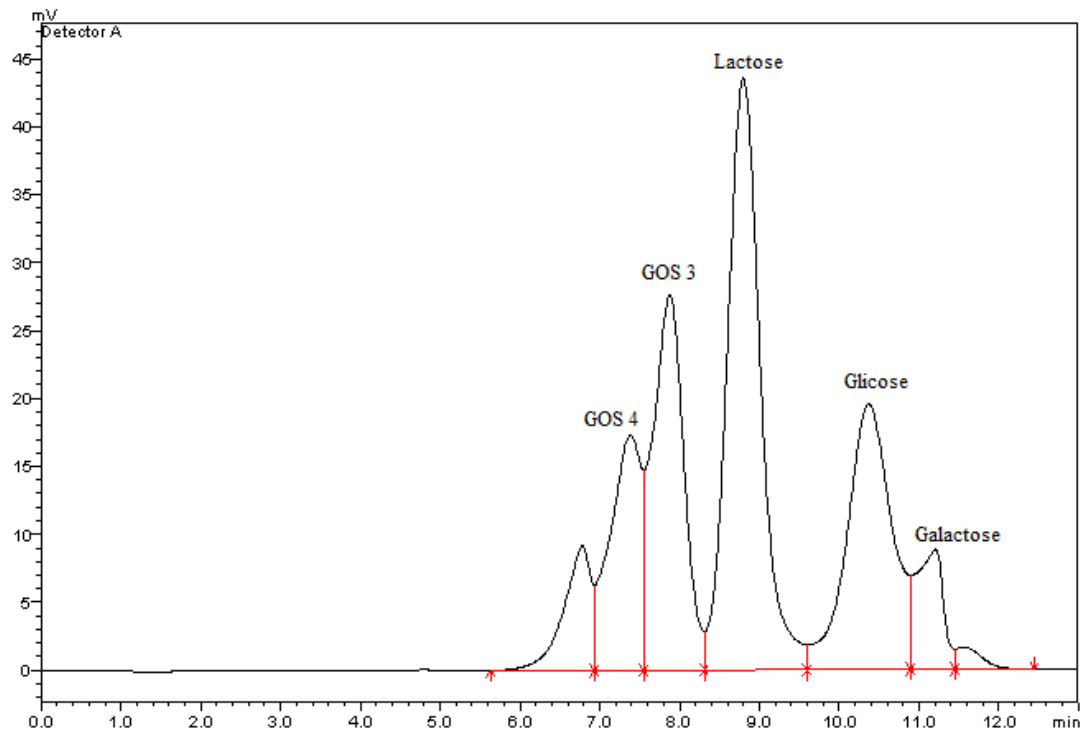
ZENEBON, O., PASCUET, N. S., TIGLEA, P. **Instituto Adolfo Lutz.** Métodos físico-químicos para análise de alimentos. São Paulo, p. 1020, 2008.

ANEXOS

ANEXO 1 – Cromatogramas iniciais das soluções de soro de queijo e permeado de soro de queijo a 50°C, 400 g/L e pH 7, respectivamente.



ANEXO 2 – Cromatogramas dos maiores rendimentos de síntese de GOS em soro de queijo e permeado de soro de queijo, respectivamente, em pH 7, 400 g/L a 50°C.



ANEXO 3 – Cromatograma GOS comercial – Oligomate 55N

