

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**SÍNTESE DE GALACTO-OLIGOSSACARÍDEOS A PARTIR DE
SORO DE QUEIJO POR REAÇÃO ENZIMÁTICA**

Bruna Payão Rossetto

Engenharia de Alimentos, UEM, 2009

Orientador: Prof. Gisella Maria Zanin, Dr^a. Eng^a.

Dissertação de Mestrado submetida à
Universidade Estadual de Maringá,
como parte dos requisitos necessários
à obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Química, área de
Desenvolvimento de Processos.

Maringá-PR-Brasil

Setembro de 2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá, PR, Brasil)

R829s Rossetto, Bruna Payão
Síntese de galacto-oligossacarídeos a partir de soro de queijo por reação enzimática / Bruna Payão Rossetto. -- Maringá, 2013.
xiii, 64 f. : il. color., figs., tabs.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Gisella Maria Zanin.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Tecnologia, Departamento de Engenharia Química, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, 2013.

1. Galacto-oligossacarídeos. 2. Beta-galactosidase. 3. Soro de queijo. 4. Soro de queijo em pó - Subproduto. 5. Reação transgalactosilação. 6. Hidrólise enzimática - Lactose. I. Zanin, Gisella Maria, orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Tecnologia. Departamento de Engenharia Química. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. III. Título.


CDD 21.ed. 660.634


AMMA-002986

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

Esta é a versão final da Dissertação de Mestrado apresentada por Bruna Payão Rossetto perante a Comissão Julgadora do Curso de Mestrado em Engenharia Química em 10 de setembro de 2013.

COMISSÃO JULGADORA


Prof.ª Dr.ª Gisella Maria Zanin
Orientadora / Presidente


Prof.ª Dr.ª Rita de Cássia Bergamasco
Membro


Prof. Dr. Flávio Faria de Moraes
Membro

AGRADECIMENTOS

- a Deus, que me estendeu as mãos e me guiou, me amparando nos momentos difíceis e me dando força para superar as dificuldades, mostrando o caminho nas horas incertas.

- à minha Família, sempre presente e vibrante, me incentivando e fortalecendo nos momentos mais difíceis.

- à professora Gisella Maria Zanin, por toda a paciência, conhecimento e colaboração dedicados a este trabalho.

- aos engenheiros Lauro Mitsuaki Kambara e Luiza Pedrina Vilxenski Calsavara, sempre disponíveis e atenciosos, pelos conselhos e sugestões dados nesse tempo de trabalho no laboratório.

- aos colegas e amigos com quem partilhei as dúvidas, as dificuldades e os momentos de alegria nesses dois anos, sempre me ajudando e incentivando.

- à CAPES, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela bolsa e suporte financeiro concedido durante o trabalho.

SÍNTESE DE GALACTO-OLIGOSSACARÍDEOS A PARTIR DE SORO DE QUEIJO POR REAÇÃO ENZIMÁTICA

AUTOR: BRUNA PAYÃO ROSSETTO

ORIENTADOR: PROF^a. DR^a. GISELLA MARIA ZANIN

Dissertação de Mestrado; Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química; Universidade Estadual de Maringá; Av. Colombo, 5790, BL E46 – 09; CEP: 87020-900 - Maringá – PR, Brasil, defendida em 10 de setembro de 2013.

RESUMO

O objetivo do trabalho foi realizar a síntese de galacto-oligossacarídeos (GOS) a partir da lactose presente no soro de queijo por meio da reação com a enzima comercial β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis*. A atividade enzimática foi determinada como uma função do pH e da temperatura e, em seguida, foram obtidas as condições para a atividade máxima. Estudou-se a estabilidade térmica da enzima e determinada a melhor temperatura para realizar as reações de síntese de GOS. Os experimentos foram realizados em reator batelada, e a atividade determinada pelo método das velocidades iniciais. A síntese dos GOS foi realizada em incubadora rotatória em meio não-aquoso e os carboidratos identificados e quantificados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Primeiramente, foi analisada a capacidade da enzima em realizar a reação de transgalactosilação em alta concentração de lactose (30%) e, em seguida, a hidrólise da lactose em baixa concentração de lactose (10%). A atividade da enzima comercial β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* (Lactozym 2600L) foi 1663,75 U.mL⁻¹ e a atividade específica máxima 2,67 U.mg⁻¹ determinada a 45 °C e pH 6,5, e a menor atividade 0,85 U.mg⁻¹ em 50 °C e pH 7,5. Para reações em tempos longos (6 horas) recomenda-se usar a enzima em temperaturas inferiores a 45 °C, sendo 40 °C o valor mais apropriado porque apresenta atividade somente 12 % menor que a máxima. A concentração máxima de GOS foi de 71,45 g.L⁻¹, alcançada em 6 horas de reação a 40 °C, pH 6,5, 10 U.mL⁻¹ de enzima e 40 % de lactose (m/v). Nessas condições a o rendimento

máximo da síntese foi igual a 23,82 % e o produto formado apresentou 27,14 g.L⁻¹ de galactose, 46,13 g.L⁻¹ de glicose e 155,28 g.L⁻¹ de lactose.

SYNTESIS OF GALACTO-OLIGOSSACHARIDES FROM CHEESE WHEY BY ENZYMATIC REACTION

AUTHOR: BRUNA PAYÃO ROSSETTO

SUPERVISOR: GISELLA MARIA ZANIN

Master Thesis; Chemical Engineering Graduate Program; State University of Maringá; Av. Colombo, 5790, BL E46 – 09; CEP: 87020-900 – Maringá – PR, Brazil, presented on September 10, 2013.

ABSTRACT

The aim of this work was the synthesis of galacto-oligosaccharides (GOS) from lactose present in cheese whey by commercial enzyme β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. The enzyme activity was first determined as a function of pH and temperature, and then the conditions for maximum activity were obtained. Next, the thermal stability of the enzyme was studied and the best temperature for carrying out the reaction for long periods was determined. These experiments were performed in a batch reactor, and the activity determined by the method of initial rates. The synthesis of GOS was performed, in an orbital shaker incubator in a non-aqueous medium and the carbohydrates identified and quantified by High Performance Liquid Chromatography (HPLC). First, the enzyme capacity to perform the transgalactosylation reaction at high lactose (30%) concentration was studied and then the hydrolysis of lactose was followed throughout the reaction, when the concentration of lactose was low (10%). The activity of the commercial enzyme β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* (Lactozym 2600L) was $1663.75 \text{ U.mL}^{-1}$ and the maximum specific activity 2.67 U.mg^{-1} determined at $45 \text{ }^\circ\text{C}$ and pH 6.5, and the lowest activity 0.85 U.mg^{-1} at $50 \text{ }^\circ\text{C}$ and pH 7.5. For long reactions it is recommended use the enzyme at temperatures below $45 \text{ }^\circ\text{C}$, with $40 \text{ }^\circ\text{C}$ being the most appropriate value because it gives an activity only 12 % lower than the maximum. The maximum concentration of GOS 71.45 U.mL^{-1} was achieved in 6 hours of reaction at $40 \text{ }^\circ\text{C}$, pH 6.5, 10 U.mL^{-1} of enzyme and 40 % lactose (w/v). Under these conditions the

maximum yield of synthesis obtained was 23.82 % and the formed product contains galactose 27.14 g.L⁻¹, glucose 46.13 g.L⁻¹ and lactose 155.28 g.L⁻¹.

ÍNDICE DE TEXTO

1. CAPITULO I.....	1
1.1. Introdução	1
1.2. Objetivos.....	3
2. CAPITULO II.....	4
2.1. Soro de queijo	4
2.2. Lactose	5
2.3. β-galactosidase	6
2.4. Oligossacarídeos	9
2.4.1. Galacto-oligossacarídeos (GOS).....	10
2.5. Síntese de Galacto-oligossacarídeos	14
2.5.1. Reação de transgalactosilação.....	15
2.5.2. Hidrólise Enzimática da Lactose.....	17
3. CAPITULO III	19
3.1. Materiais.....	19
3.2. Equipamentos	19
3.3. Métodos	20
3.3.1. Caracterização do soro de queijo em pó	20
3.3.2. Determinação da concentração de glicose	23
3.3.3. Teor de proteína da enzima.....	23
3.3.4. Determinação da atividade enzimática.....	24
3.3.5. Síntese de Galacto-oligossacarídeos	28
3.3.6. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	29
4. CAPITULO IV.....	32
4.1. Caracterização do soro de queijo em pó.....	32
4.2. Atividade enzimática da β-galactosidase:.....	32
4.2.1. Atividade específica em função do pH e da temperatura:.....	32
4.2.2. Estabilidade térmica.....	34

4.3. Síntese de Galacto-oligossacarídeos	35
4.3.1. Produção de galacto-oligossacarídeos (teste em pH 6,5 e 7).....	35
4.3.2. Produção de galacto-oligossacarídeos (10, 20 e 30% de lactose).....	37
5. <i>CAPITULO V</i>	48
6. <i>CAPITULO VI</i>.....	49
7. <i>CAPITULO VII</i>	50
8. <i>CAPITULO VIII</i>.....	55
8.1. Gráficos e equações da influência do pH e da temperatura na atividade enzimática.....	55
8.2. Gráficos do ensaio de estabilidade térmica (lactose 5% e pH 6,5)....	60

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1: Representação esquemática da estrutura química da lactose (BOBBIO & BOBBIO, 1992).	5
Figura 2.2: Rotas enzimáticas da conversão da lactose por meio da β -galactosidase (MARTINS e BURKERT, 2009).....	8
Figura 2.3: Esquema dos processos de hidrólise e transgalactosilação da enzima β -galactosidase para a produção de diferentes GOS (adaptada de Otieno, 2010).	16
Figura 2.4: Mecanismo de reação de hidrólise e de transgalactosilação da lactose pela β -galactosidase (LISBOA 2008, MANERA, 2010).	17
Figura 3.1: Modelo esquemático do método de Kjeldahl para determinação de proteína.	22
Figura 3.2: Esquema de um reator batelada.	25
Figura 3.3: Perfil cromatográfico do ensaio a 40 % de lactose, 40 °C, pH 6,5 em 6 horas de reação.	31
Figura 4.1: Atividade específica em função do pH e da temperatura.	34
Figura 4.2: Estabilidade térmica em função da temperatura em pH 6,5.	35
Figura 4.3: Consumo da lactose e produção de glicose, galactose e galacto-oligossacarídeos ao longo da reação em pH 6,5 e 7,0, temperatura de 40 °C, em diferentes concentrações de enzima.	36
Figura 4.4: Concentração de lactose, glicose, galactose e GOS em função do tempo de reação, com concentração inicial de 10% de lactose em pH 6,5, em função da temperatura e concentração de enzima.....	39
Figura 4.5: Concentração de lactose, glicose, galactose e GOS em função do tempo de reação, com concentração inicial de 20% de lactose em pH 6,5, em função da temperatura e concentração de enzima.....	40
Figura 4.6: Concentração de lactose, glicose, galactose e GOS em função do tempo de reação, com concentração inicial de 30% de lactose em pH 6,5, em função da temperatura e concentração de enzima.....	41
Figura 4.7: Resultados de rendimento e produtividade de GOS e conversão de lactose para os ensaios a 10% de lactose inicial, pH 6,5 em função da temperatura e concentração de enzima.	43
Figura 4.8: Resultados de rendimento e produtividade de GOS e conversão de lactose para os ensaios a 20% de lactose inicial, pH 6,5 em função da temperatura e concentração de enzima.	44

Figura 4.9: Resultados de rendimento e produtividade de GOS e conversão de lactose para os ensaios a 30% de lactose inicial, pH 6,5 em função da temperatura e concentração de enzima.	45
Figura 4.10: Formação de galacto-oligossacarídeos versus conversão de lactose nas diferentes temperaturas, concentrações de enzima e de lactose, no pH 6,5.	46
Figura 8. 1: Concentração da glicose em função do tempo de reação em solução de lactose 5% e pH 6,0, em diferentes temperaturas.	56
Figura 8. 2: Concentração da glicose em função do tempo de reação em solução de lactose 5% e pH 6,5, em diferentes temperaturas.	57
Figura 8. 3: Concentração da glicose em função do tempo de reação em solução de lactose 5% e pH 7,0, em diferentes temperaturas.	58
Figura 8. 4: Concentração da glicose em função do tempo de reação em solução de lactose 5% e pH 7,5, em diferentes temperaturas.	59
Figura 8. 5: Concentração da glicose em função do tempo de reação em solução de lactose 5% na temperatura de 30 °C.....	60
Figura 8. 6: Concentração da glicose em função do tempo de reação em solução de lactose 5% na temperatura de 35 °C.....	61
Figura 8. 7: Concentração da glicose em função do tempo de reação em solução de lactose 5% na temperatura de 40 °C.....	62
Figura 8. 8: Concentração da glicose em função do tempo de reação em solução de lactose 5% na temperatura de 45 °C.....	63
Figura 8. 9: Concentração da glicose em função do tempo de reação em solução de lactose 5% na temperatura de 50 °C.....	64

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 2.1: Características da enzima β -galactosidase de fungos, bactérias e leveduras (OTIENO, 2010).	7
Tabela 2.2: Rendimento de galacto-oligossacarídeos em diferentes origens de β -galactosidase (OTIENO, 2010).	12
Tabela 2.3: Benefícios dos galacto-oligossacarídeos. Fontes: ALMEIDA e PASTORE (2004), MANERA, (2010).	13
Tabela 2.4: Aplicações e vantagens da hidrólise enzimática da lactose. Fonte: MATIOLI (1991).	18
Tabela 3.1: Composição da solução tampão. Fonte: NOVO (1979); MATIOLI, MORAES e ZANIN (2001).	24
Tabela 3.2: Diluição da solução para a identificação e quantificação dos açúcares no CLAE.	30
Tabela 4.1: Caracterização química do soro de queijo em pó.	32
Tabela 4.2: Valores da atividade específica da enzima β -galactosidase em função do pH e da temperatura.	33
Tabela 4.3: Resultado da estabilidade térmica, valores da atividade da enzima em função da temperatura.	35

NOMENCLATURA

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

DBO – Demanda Bioquímica de Oxigênio

GOS – Galacto-oligossacarídeos

HPLC – High-performance liquid chromatography

ONPG – *o*-nitrofenil b-D-galactopiranosídeo

m/m – massa por massa

v/v – volume por volume

m/v – massa por volume

w/v – peso por volume

CAPITULO I

INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

1.1. Introdução

O soro de queijo pode ser definido como a fração aquosa do leite que é separada da caseína durante a produção de queijos, o soro corresponde a cerca de 90 % do volume do leite, dependendo do tipo de queijo. Já os sólidos do soro representam de 50 a 55 % dos sólidos totais do leite (TEIXEIRA e FONSECA, 2008).

Até pouco tempo atrás o soro de queijo era visto somente como um subproduto, obtido da fabricação de queijos, sendo o mesmo rico em proteínas, lactose, minerais e vitaminas. Uma parcela considerável de soro de queijo é descartada em rios provocando assim problemas ambientais devido à sua alta demanda bioquímica de oxigênio (DBO), aproximadamente 100 vezes maior que a do esgoto doméstico (ALENCAR, 2011). Por isso, há uma busca por novas alternativas para o processamento da lactose presente no soro de queijo como um passo crucial para que as indústrias possam se adequar às legislações ambientais.

O soro de queijo pode ser aproveitado tanto como matéria-prima, por exemplo, na elaboração de bebidas lácteas, além da utilização em modernas tecnologias para obtenção de produtos específicos e/ou novos a serem utilizados principalmente pelas indústrias alimentícias. Porém, antes de seu aproveitamento é necessário fazer a determinação do perfil de qualidade microbiológico e físico-químico, que determinará quais os melhores processos para seu uso (TEIXEIRA e FONSECA, 2008).

A enzima β -galactosidase é a responsável pela hidrólise da lactose, sua importância industrial está na aplicação na indústria de laticínios, pois garante a produção de alimentos com baixo teor de lactose, melhor solubilidade e digestibilidade do leite e derivados (TOMAL et. al., 2010). Com isso, os problemas associados com a eliminação do soro, cristalização de lactose em certos alimentos congelados e o consumo de leite por indivíduos com intolerância à lactose, podem ser reduzidos (SANTOS, 2006).

A lactose é um dissacarídeo, que ao sofrer hidrólise, forma como produtos glicose e galactose. A hidrólise enzimática da lactose tem se mostrado um dos métodos mais promissores para remover a lactose do leite e de seus subprodutos, como o soro.

Dependendo do nível de hidrólise, o leite com lactose pré-digerida terá um gosto ligeiramente mais doce. Durante a hidrólise enzimática da lactose, além dos principais produtos da hidrólise, quantidades consideráveis de oligossacarídeos são formadas (CARMINATTI, 2001).

Os galacto-oligossacarídeos são compostos de lactose e unidades de galactose, produzidos comercialmente por reação enzimática, onde resíduos de galactose estão ligados à lactose (ALMEIDA, 2003). Os galacto-oligossacarídeos além de serem produzidos por reação enzimática e ser componente natural do leite humano, podem também ser encontrados em alguns vegetais, como cebola, alho, banana, soja e chicória (SANTOS, 2006).

Os galacto-oligossacarídeos são carboidratos não digeríveis, apresentando configuração β , enquanto as enzimas digestivas gastrointestinais humanas são específicas principalmente para ligações α , dessa forma, os GOS se tornam resistentes às enzimas digestivas em humanos e são fermentados por bifidobactérias (SANTOS, 2006 e LISBOA, 2008). Os produtos (açúcares) obtidos desta reação são os galacto-oligossacarídeos, glicose e galactose (LISBOA, 2008), podendo-se conseguir, desta forma, a obtenção de produtos de maior valor agregado a partir do soro de leite ou outro substrato que contenha a lactose. Os GOS também são responsáveis por aumentar a mineralização óssea e a resistência contra fraturas, devido à estimulação da absorção de cálcio (ALMEIDA, 2003).

Alguns dos benefícios dos galacto-oligossacarídeos observados do ponto de vista industrial são a maior solubilidade em comparação com a sacarose, a não cristalização, não precipitação, além de não deixar a sensação de secura na boca. Assim, os galacto-oligossacarídeos podem ser usados em formulações de sobremesas lácteas, leites fermentados, geleias, bebidas e produtos de confeitaria (SANTOS, 2006). Alimentos infantis e alimentos especiais para idosos e hospitalizados são promissores na aplicação de galacto-oligossacarídeos, devido à maior suscetibilidade a mudanças na microflora intestinal. O pão também é um alimento apropriado para a inclusão destes, pois durante a fermentação com a levedura e o cozimento do pão, os GOS não são degradados, e auxiliam a obter um pão de excelente sabor e textura (ALMEIDA, 2003).

A quantidade de galacto-oligossacarídeos formada a partir da lactose sofre influência com a concentração da enzima, o tempo de reação e a temperatura, além da

concentração inicial de lactose e a presença de inibidores ou ativadores específicos para a enzima (SANTOS, 2006).

1.2. Objetivos

O objetivo geral desta pesquisa foi desenvolver um estudo para avaliar a produção de GOS a partir da lactose do soro de queijo por meio da reação de transgalactolisação com a enzima β -galactosidase comercial.

Os objetivos específicos foram:

- Determinar a atividade enzimática da enzima β -galactosidase.
- Determinar a atividade específica em função do pH e da temperatura.
- Determinar a estabilidade térmica da enzima.
- Determinar a influência da temperatura, concentração de lactose e da enzima na obtenção de galacto-oligossacarídeos.

CAPITULO II

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Soro de queijo

Soro de queijo é um resíduo importante gerado a partir das indústrias leiteiras, conhecido por ser fonte de muitos compostos bioativos de significado comercial. A produção mundial de soro de queijo está estimada em mais de 10⁸ toneladas por ano, com incremento anual de 1-2 % (GUIMARÃES, TEIXEIRA e DOMINGUES, 2010). O Brasil é o quinto maior produtor de leite do mundo com mais de 29 milhões de toneladas, respondendo por 5,3 % da produção mundial em 2010 (PAULA et. al., 2012).

Dentre os queijos mais produzidos no Brasil, está o queijo minas e suas variedades mais importantes, minas frescal e minas-padrão. A proporção de leite na fabricação de queijo é aproximadamente 10 litros de leite para 1 kg de queijo, gerando 9 litros de soro de queijo. Contudo, somente 15 % do soro de leite disponível são usados pelas indústrias, enquanto o restante é descartado como água residual no meio ambiente, causando sérios problemas ambientais para indústrias de laticínios (HÚNGARO et. al., 2013). Além da alta carga orgânica do soro, representando importante fonte de poluição ambiental, o soro de queijo provoca elevadas perdas econômicas para a indústria, visto o alto custo com tratamento de efluente do mesmo (GABARDO, 2011).

O soro de queijo é um subproduto da indústria láctea, constituindo-se em um líquido verde-amarelo e sabor ligeiramente ácido ou doce, obtido após a precipitação e remoção da caseína do leite, por coagulação ácida ou enzimática (GABARDO, 2011). O soro apresenta em sua composição cerca de 93 % de água e somente 7 % de matéria seca, onde 10-12 % são proteínas, 74 % lactose, 8 % minerais e 3 % gordura (HÚNGARO et. al., 2013).

Por seu alto valor nutricional, rico em proteínas, minerais e vitaminas, o soro pode ser utilizado como matéria-prima barata e sustentável para a produção de novos produtos com alto valor agregado (CASTRO et. al., 2009). Na indústria alimentícia, o soro pode ser utilizado na produção de doce de leite, bebidas lácteas, queijo ricota, fabricação de bolachas, leite em pó, creme de leite, alguns tipos de refresco vitaminado, entre outros tipos de produtos (PAULA et. al., 2012).

O soro de queijo também pode ser utilizado em alguns processos biotecnológicos, devido à sua composição nutricional. A produção da enzima β -galactosidase a partir de soro de queijo, por exemplo, tem sido muito estudada mostrando excelentes resultados. A enzima, também conhecida como lactase é utilizada na fabricação de leite com baixo teor de lactose e derivados de leite (GABARDO, 2011).

2.2. Lactose

A lactose (Galactose β -1,4 glucose) é o açúcar presente no leite e seus derivados, considerado um dos principais constituintes do soro de queijo. A molécula de lactose é formada por dois monossacarídeos, a glicose e a galactose, unidos por uma ligação glicosídica do tipo β 1 \rightarrow 4, formando, portanto, um dissacarídeo com baixo poder adoçante (BOBBIO & BOBBIO, 1992). A Figura 2.1 representa a estrutura da molécula de lactose.

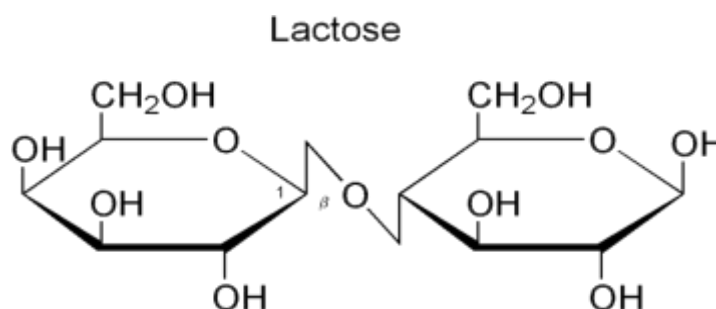


Figura 2.1: Representação esquemática da estrutura química da lactose (BOBBIO & BOBBIO, 1992).

A lactose é um açúcar raro encontrado praticamente apenas no leite e seus derivados, é uma molécula solúvel em água, onde sua solubilidade é maior em temperaturas mais elevadas e, menor em baixas temperaturas, em soluções concentradas, podendo causar cristalização e, conseqüentemente, problemas tecnológicos durante o processamento de alguns produtos na indústria de laticínios (LISBOA, 2008; CAMPOS et. al., 2009). Considerado um dissacarídeo redutor, por possuir um carbono anomérico livre no resíduo de glucose, a lactose pode reagir com os grupos amino livres das proteínas formando produtos coloridos pela reação de Maillard (MATIOLI, 2001).

A hidrólise enzimática da lactose, forma além dos principais produtos, que são a glicose e galactose, quantidades consideráveis de oligossacarídeos, tornando-se um dos métodos mais promissores para remover a lactose do leite e de seus subprodutos, como o soro (CARMINATTI, 2001).

2.3. β -galactosidase

A enzima β -galactosidase, também conhecida como lactase, é empregada como catalisador na hidrólise da lactose, formando como produtos moléculas de glicose e galactose. A hidrólise da lactose é considerada uma das maiores aplicações de enzimas na indústria de alimentos (KLEIN, 2010). Diversas são as origens para essa enzima, porém os micro-organismos (leveduras, fungos e bactérias) são considerados a fonte mais aceitável para a aplicação industrial. A β -galactosidase também é encontrada em algumas frutas como amêndoas, damascos, pêssegos, maçãs, e em órgãos de animais como intestino, cérebro, testículo, placenta (ALMEIDA, 2003).

A β -galactosidase é pouco efetiva na produção de oligossacarídeos de maior massa molecular devido à competitividade da reação de transgalactosilação da galactose com a hidrólise da lactose, quando ocorre catálise enzimática com substratos ricos em lactose. Assim, a reação de transgalactosilação é menos efetiva quanto maior for a massa molar do oligossacarídeo aceptor, explicando a formação de di, tri e tetrassacarídeos em comparação com oligossacarídeos maiores (MARTINS, 2009).

Na indústria de alimentos a lactase utilizada deve ser de origem microbiana de: *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Candida pseudotropicalis*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces fragilis*, *Kluyveromyces marxianus* e *Saccharomyces sp* (KLEIN, 2010). A Tabela 2.1 mostra as características da enzima β -galactosidase em suas diferentes origens. Em geral, o pH ótimo da lactase de fungos fica numa faixa ácida de 2,5 a 4,5, indicado para a hidrólise de soro ácido. Já a lactase de leveduras fica numa faixa neutra bem como a lactase de origem bacteriana, considerando a faixa de valores de 6,0 a 7,0 e 6,5 e 7,5, respectivamente, e seu emprego é adequado para a hidrólise do leite e do soro doce (KLEIN, 2010).

Os dois principais substratos utilizados na determinação da atividade da enzima β -galactosidase são a lactose e o substrato sintético ONPG (*o*-nitrofenil b-D-galactopiranosídeo), liberando pela reação D-glicose e *o*-nitrofenol, respectivamente, podendo ser determinados por espectrofotometria (WALLENFELS e MALHOTRA, 1961).

Tabela 2.1: Características da enzima β -galactosidase de fungos, bactérias e leveduras (OTIENO, 2010).

Origem	pH _{ótimo}	T _{ótima}	Lactose		Ativador	Inibidor
			K _m (mM)	M, kD		
Fungos:						
<i>Aspergillus niger</i>	3,5	58	85	124	-	-
<i>Aspergillus oryzae</i>	5,0	55	50	90	-	-
Levedura:						
<i>Kluyveromyces lactis</i>	6,5	37	35	115	K ⁺ , Mg ²⁺	Ca ²⁺ , Na ²⁺ , Zn, Cu
<i>Kluyveromyces fragilis</i>	6,6	30	0,23-0,99 (ONPG)	200	-	SDS
<i>Sterigmatomyces elviae</i> CBS8119	6,0	60	-	-	Fe ²⁺ , Zn ²⁺ , Cu ²⁺	-
Bactéria:						
<i>Escherichia coli</i>	7,2	40	2	540	Na ⁺ , K ⁺	-
<i>Bacillus subtilis</i>	6,5	50	700	-	-	-
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	6,2	55	2	220	Mg ²⁺	-
<i>Lactobacillus thermophilus</i>	6,2	55	6	540	-	-
<i>Lactobacillus reuteri</i> L103	8,0	45	13	35	Na ⁺ , K ⁺ , e Mn ²⁺	Fe ²⁺ , Ca ²⁺ , Cu ²⁺ , e Zn ²⁺
<i>Lactobacillus reuteri</i> L461	6,5	50	31	72	Na ⁺ , K ⁺ , e Mn ²⁺	Fe ²⁺ , Ca ²⁺ , Cu ²⁺ , e Zn ²⁺
<i>Bullera singularis</i> KCTC 7534	5	50	580	53	-	Ag ³⁺ , SDS
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	7,0	70	2,96	70	-	Fe ²⁺ , Zn ²⁺ , Cu ²⁺ , Pb ²⁺ , e Sn ²⁺
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	4,8	45	800	362	EDTA	Zn ²⁺ , Mn ²⁺ , Co ²⁺ , Ca ²⁺ , Sn ²⁺
<i>Bifidobacterium infantis</i>	5,0	60	2,6	470	Na ⁺ , K ⁺	Cr ³⁺ , EDTA ^c , uréia, galactose PCMB
<i>Bacillus circulans</i>	6,0	65	41,7	67	-	-
<i>Bacillus coagulans</i>	6,5	55	50	430	EDTA	Fe ³⁺ , Cu ²⁺ , Zn ²⁺ , e galactose

Industrialmente a enzima β -galactosidase tem grande importância tanto por sua utilização no rompimento das ligações glicosídicas da lactose, formando uma solução de glicose e galactose com leve aumento do sabor doce, como por sua função de catalisador na síntese de oligossacarídeos, e também na redução de problemas como eliminação do soro, cristalização da lactose em alimentos congelados e o consumo de leite e derivados por pessoas intolerantes à lactose (ALMEIDA, 2003; SANTOS, 2006).

A enzima β -galactosidase é usada tanto para catalisar as reações de hidrólise como as de transgalactosilação, ou seja, a enzima transfere a unidade de galactose para um aceptor que contenha um grupo hidroxila. Na hidrólise, com a água atuando como aceptor, são formadas glicose e galactose. Contudo, a lactose presente na solução pode também servir como aceptor e, assim, são formados os galacto-oligossacarídeos por meio da reação de transgalactosilação (LISBOA et. al., 2012).

A Figura 2.2 mostra o esquema das duas rotas de conversão da lactose por meio da enzima β -galactosidase.

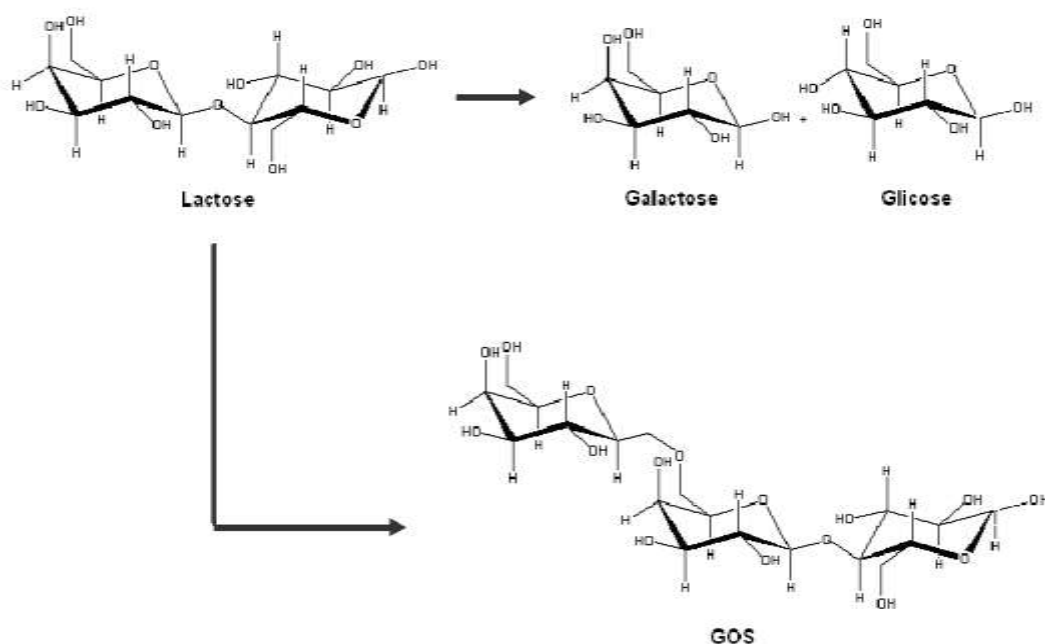


Figura 2.2: Rotas enzimáticas da conversão da lactose por meio da β -galactosidase (MARTINS e BURKERT, 2009).

2.4. Oligossacarídeos

Os oligossacarídeos são carboidratos que contêm de 2 a 10 monossacarídeos, unidos por ligações glicosídicas (MARTINS e BURKERT, 2009). Podem ser encontrados como componentes naturais em muitos alimentos como frutas, vegetais, leite e mel. E também, serem obtidos por extração de tecidos vegetais, por fermentação microbiana, por catálise enzimática ou por reação química (MARTINS, 2009).

Os oligossacarídeos são muito utilizados na indústria alimentícia (bebidas, adoçantes, formulação de leite em pó infantil), na indústria de ração animal com inibição de salmonela e na indústria de medicamentos (cosméticos, produtos farmacêuticos e produtos para diabéticos). Contudo, o principal uso dos oligossacarídeos deve-se à produção de bifidobactérias (microbiota benéfica) no intestino (TOMAL et. al., 2010).

Na indústria de alimentos, o principal interesse no uso dos oligossacarídeos deve-se às suas propriedades físicas, e características físico-químicas, podendo ser usados como açúcares de baixa cariogenicidade em confeitos, gomas de mascar, iogurtes e bebidas (SANTOS, 2006), enquanto as suas propriedades biológicas e físico-químicas têm sido consideradas equivalentes às das fibras dietéticas, importantes para a saúde humana (MARTINS, 2009).

Entre os oligossacarídeos não digeríveis mais utilizados na indústria alimentícia estão os fruto-oligossacarídeos e galacto-oligossacarídeos, geralmente produzidos por transglicosilação enzimática. Os oligossacarídeos são solúveis em água e possuem baixo poder adoçante, correspondendo a aproximadamente 0,3 a 0,6 vezes em relação à sacarose. A doçura dos oligossacarídeos está relacionada com a estrutura química, a massa molar e aos níveis de mono e dissacarídeos presentes na mistura (LISBOA, 2008).

Alguns dos principais oligossacarídeos são (MARTINS, 2009):

- ✓ *INULINA*: importante na indústria de alimentos; é reserva de carboidrato em muitas plantas dicotiledôneas e produzida via extração de raízes de chicória e outros vegetais.
- ✓ *OLIGOFRUTOSE*: importante na produção de alimentos; é formado por 2 a 4 unidades de frutose ligadas ao resíduo terminal da glicose.
- ✓ *GALACTO-OLIGOSSACARÍDEO*: formado pela transgalactosilação da galactose por ação enzimática da β -galactosidase, a partir de substratos ricos em lactose.
- ✓ *RAFINOSE*: obtida por extração vegetal (soja).

- ✓ *XILO-OLIGOSSACARÍDEO*: obtidos a partir da hidrólise parcial de polixilanos por meio da enzima β -xilânase.
- ✓ *GLICO-OLIGOSSACARÍDEOS*: obtidos por transglicosilação da glicose via α -glicosidase.

2.4.1. Galacto-oligossacarídeos (GOS)

Os galacto-oligossacarídeos são um grupo de oligossacarídeos não digeríveis, compostos por moléculas de galactose ligada à lactose, formando de tri a hexassacarídeos com 2-5 unidades de galactose, resistentes às enzimas digestivas e fermentados por bifidobactérias (SANTOS, SIMIQUELI e PASTORE, 2009).

Os galacto-oligossacarídeos podem ser encontrados na natureza (leite humano, cebola, alho, banana, soja e chicória) ou serem sintetizados por via enzimática ou por via química. Na síntese química muitas etapas de proteção e desproteção das hidroxilas dos açúcares são envolvidas, resultando em baixo rendimento dos produtos finais. Enquanto na síntese enzimática geralmente poucos subprodutos são produzidos, evitando a necessidade de proteção e desproteção química, além desta reação apresentar baixo impacto ambiental (MANERA, 2010).

Os GOS são comercializados na forma líquida ou em pó, caracterizado como uma mistura de várias espécies moleculares de oligossacarídeos (mais que 55 %), lactose (aproximadamente 20 %), glicose (aproximadamente 20 %) e uma pequena quantidade de galactose (TOMAL e colaboradores, 2010).

Algumas das propriedades dos galacto-oligossacarídeos são (TOMAL et. al., 2010):

- ✓ Produção de ácidos graxos benéficos de cadeia curta,
- ✓ Aumento da absorção de cálcio e magnésio,
- ✓ Eliminação de compostos tóxicos,
- ✓ Resistência à hidrólise das enzimas digestivas intestinais,
- ✓ Possuir efeitos fisiológicos semelhantes ao das fibras dietéticas.

Os galacto-oligossacarídeos podem atuar como aceptores intermediários, formando oligossacarídeos de cadeia maior ou tornando-se substrato para a enzima, para serem hidrolisados lentamente. Quanto maior a massa molar do oligossacarídeoceptor, menos efetiva será a reação de transgalactosilação, ocorrendo assim uma maior formação de di, tri e tetrassacarídeos em comparação com oligômeros maiores. As enzimas β -galactosidases

de *Kluyveromyces* produzem principalmente trissacarídeos (BOON, JANSSEN, RIET, 2000).

A produção de galacto-oligossacarídeos ocorre a partir de substratos ricos em lactose, como por exemplo, o leite, o soro de queijo ou uma mistura dos dois. Sabe-se que a conversão da lactose aumenta com o aumento da concentração inicial do substrato (lactose), reduzindo assim a atividade de água na solução. Logo, a adição de soro de queijo em uma solução de leite utilizada como substrato para a β -galactosidase, implicaria no aumento da concentração de lactose no meio, no incremento da proteína e conseqüentemente na redução da atividade de água (MARTINS, 2009).

Tomal e colaboradores (2010) citam alguns trabalhos que apontam a correlação entre a reação de transgalactosilação, a concentração inicial de lactose e a origem da enzima. Apenas alguns trabalhos apresentaram síntese de GOS com mais de 40 % de rendimento. Os trabalhos que utilizaram enzimas de leveduras em pH acima de 6,3 e temperaturas entre 35 e 50 °C apresentaram rendimento de galacto-oligossacarídeos de 13 a 31 %. Em trabalhos com enzimas de fungos com pH entre 4,5 e 6,5 e temperatura de 40 a 55 °C, a produção de galacto-oligossacarídeos foi de 17 a 32 %. E nos trabalhos com enzimas de bactérias em pH 4,5 a 6,0 e temperatura de 60 °C, alcançaram cerca de 60 a 64 % de GOS.

Chockchaisawasdee e colaboradores , (2005) fizeram um estudo sobre a relação da concentração de lactose e enzima na síntese de galacto-oligossacarídeos a partir de *Kluyveromyces lactis*, onde concluíram que a produção de galacto-oligossacarídeos é dependente da concentração de lactose, porém não depende da concentração de enzima, logo, a maior produção de galacto-oligossacarídeos obtida em 40 °C e pH 7, e a faixa de lactose e enzima testada, foram de 220 a 400 mg/mL e 3 a 9 U/mL, respectivamente.

A Tabela 2.2 apresenta as condições para a obtenção de galacto-oligossacarídeos a partir de diferentes origens da enzima β -galactosidase, e os respectivos rendimentos de GOS.

Tabela 2.2: Rendimento de galacto-oligossacarídeos em diferentes origens de β -galactosidase (OTIENO, 2010).

Fonte	Modo	Condições reacionais	Produtividade (rendimento de GOS)
<i>Aspergillus oryzae</i>	Batelada (SE)	38% de lactose, 40°C e pH 4,5	32%
<i>Aspergillus oryzae</i> ATCC 20423	Batelada (IE)	30°C e pH 4,6, concentração de lactose não determinada	26%
<i>Aspergillus oryzae</i>	Contínuo (IE, PBR)	4,0% de lactose, 40 °C e pH 4,5	26,6%
<i>Bacillus circulans</i>	Batelada (IE)	4,56% de lactose, 40 °C e pH 6,0	24%
<i>Bacillus circulans</i>	Contínuo (IE, CSTR)	4,56% de lactose, 40 °C e pH 6,0	40%
<i>Bacillus singularis</i>	Batelada (IE)	30% de lactose, 45 °C e pH 3,7	54%
<i>Bacillus singularis</i>	Contínuo (IE, PBR)	10% de lactose, 45 °C e pH 4,8	55%
<i>Thermus aquaticus</i> YT-1	Batelada (IE)	16% de lactose, 70 °C e pH 4,0	34,8%
<i>Lactobacillus reuteri</i>	Batelada	Não determinado	36%
<i>Lactobacillus reuteri</i>	Contínuo (CSTR)	Não determinado	30%
<i>Pyrococcus furiosus</i> (F426Y)	Batelada	70% (m/v) de lactose, 95 °C e pH 5,0	45%
<i>Penicillium simplicissimum</i>	Batelada	60% (m/v) de lactose, 50 °C e pH 6,5	30,5%
<i>Kluyveromyces lactis</i> (Lactozym 3000 L HP G)	Batelada	25% (m/v) de lactose, 40 °C e pH 6,5	17,1 %
<i>Bullera singularis</i> KCTC 7534	Batelada	20% (m/v) de lactose, 50 °C e pH 5,0	50%
<i>Saccharopolyspora reactivigula</i>	Batelada	60% (m/v) de lactose, 70 °C e pH 6,0	41%
<i>Bifidobacterium bifidum</i> BB-12	Batelada	5 a 30% (m/m) de lactose, 55 °C e pH 7,5	37,6%
<i>Bifidobacterium bifidum</i> NCIMB 41171	Contínuo	45-50% (m/m) de lactose, 40-45 °C e pH 6,8	43,8%
<i>Bifidobacterium angulatum</i>	Batelada (agitado)	5 a 30% (m/m) de lactose, 55 °C e pH 7,5	43,8%
<i>Bifidobacterium infantis</i>	Batelada (agitado)	5 a 30% (m/m) de lactose, 55 °C e pH 7,5	47,6%
<i>Bifidobacterium pseudolongum</i>	Batelada (agitado)	5 a 30% (m/m) de lactose, 55 °C e pH 7,5	26,8%
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	Batelada (agitado)		43,1%

Os galacto-oligossacarídeos podem ser usados nos seguintes produtos (TOMAL e colaboradores, 2010; OTIENO, 2010 e MANERA, 2010):

- ✓ Como adoçantes em leite fermentado, pães, geleias, bebidas, produtos de confeitaria, e formulações de sobremesas lácteas.
- ✓ Alimentos infantis e alimentos especiais para idosos e hospitalizados, devido à maior susceptibilidade dessas pessoas a mudanças na microflora intestinal.
- ✓ Alimentos para diabéticos, pois os galacto-oligossacarídeos apresentam cerca de um terço do poder adoçante da sacarose e não são calóricos.
- ✓ No pão, pois durante a fermentação com a levedura e o cozimento, o GOS não é degradado, e auxilia no sabor e textura.

A Tabela 2.3 mostra os principais benefícios dos galacto-oligossacarídeos, tanto na saúde humana como na produção industrial.

Tabela 2.3: Benefícios dos galacto-oligossacarídeos. Fontes: ALMEIDA e PASTORE (2004), MANERA, (2010).

Saúde Humana	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Aumento da proliferação de bifidobactérias no trato intestinal. ➤ Redução da formação de metabólitos tóxicos. ➤ Proteção de infecção intestinal. ➤ Prevenção da diarreia patogênica. ➤ Favorecimento da absorção de cálcio, magnésio e fósforo presentes na dieta humana. ➤ Redução dos níveis séricos de colesterol. ➤ Redução da pressão arterial. ➤ Aumento da imunidade celular (propriedades anticarcinogênicas). ➤ Produção de vitaminas do complexo B. ➤ Redução na produção de substâncias nocivas ao hospedeiro (amônia e aminas, nitrosaminas, fenóis e cresóis, estrógenos, ácidos biliares secundários e agliconas).
Produção Industrial	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Conservação da secreção de insulina no pâncreas. ➤ Maior solubilidade do que a sacarose. ➤ Não cristalizam. ➤ Não precipitam. ➤ Mais estáveis em condições adversas de pH e temperatura.

2.5. Síntese de Galacto-oligossacarídeos

Alguns fatores favorecem a síntese efetiva de galacto-oligossacarídeos, como a fonte e a concentração da enzima, a temperatura, o pH e a concentração do substrato (BOON, JANSSEN, RIET, 2000; LISBOA et. al., 2012). A fonte da β -galactosidase gera grandes diferenças entre a quantidade, o grau de polimerização e o tipo de galacto-oligossacarídeos formados (BOON, JANSSEN, RIET, 2000). É necessária também a preparação da enzima β -galactosidase termicamente estável e com alta atividade de transgalactosilação. Como produtos da reação tem-se principalmente os trissacarídeos, 4'e 6'-galactosil-lactose, alguns oligossacarídeos com 4 ou mais unidades de monossacarídeos, e grande quantidade de dissacarídeos transgalactosilados (TOMAL et. al., 2010).

A alta concentração de lactose favorece a formação de GOS por transgalactosilação, enquanto a baixa concentração favorece a reação de hidrólise (MANERA, 2010; TOMAL et. al., 2010). Segundo Tomal e colaboradores (2010), apesar das diversas pesquisas sobre a produção de galacto-oligossacarídeos, poucos trabalhos apresentam síntese com mais de 40% de rendimento. Para a identificação dos GOS, a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) vem se mostrando ser o método mais eficaz.

Santos, Simiqueli e Pastore (2009) em seu trabalho sobre a produção de galacto-oligossacarídeos pela β -galactosidase de *Scopulariopsis* sp, concluíram que quanto maior a concentração de lactose no sistema maior será a produção de GOS. Já em relação à temperatura, concluíram que a produção de GOS é desfavorecida em elevadas temperaturas, superiores a 45 °C.

A síntese de GOS pode utilizar tanto a lactose pura como o soro de queijo como fonte de lactose. As proteínas e minerais podem inibir a atividade da enzima e consequentemente, a formação de oligossacarídeos. Alguns cátions como Mg^{+2} , Ca^{+2} , Zn^{+2} e Na^{+} podem ativar ou inibir a enzima, dependendo da sua origem (TOMAL et. al., 2010).

Conforme Boon, Janssen e Ries (2000) a hidrólise da ligação glicosídica, constitui uma reação de transgalactosilação, com a água sendo o aceptor. Porém na reação de transgalactosilação a água pode ser considerada um fator desfavorável à síntese de GOS quando uma grande quantidade de água está presente no meio reacional. Para minimizar esse problema, aumenta-se a concentração de lactose em sistemas aquosos ou conduz-se a reação em meios não aquosos, por exemplo, a utilização de micelas reversas. Chen, Wei e

Hu (2001), obtiveram maior rendimento de galacto-oligossacarídeos com o solvente acetato de propila, enquanto a conversão de lactose foi máxima quando utilizaram o hexano como solvente.

A Figura 2.3 mostra o esquema da reação de hidrólise da lactose e de transgalactosilação, com a formação de diferentes GOS.

2.5.1. Reação de transgalactosilação

A produção de galacto-oligossacarídeos ocorre pela reação de transgalactosilação da lactose mediada pela enzima β -galactosidase, na qual também se formam os produtos glicose e galactose. Esta reação ocorre pela transferência do resíduo de açúcar que forma a porção glicona da molécula do substrato para outra molécula de lactose. Quando essa transferência é feita para a água, a reação é chamada de hidrólise. A hidrólise da lactose é a reação direta enquanto a síntese de galacto-oligossacarídeos é a reação reversa. A alta concentração de lactose, temperatura elevada e baixa atividade de água na reação, favorecem a transgalactosilação, enquanto a hidrólise da lactose pode ser favorecida pela baixa concentração de lactose e enzima imobilizada (TOMAL et. al., 2010).

No início da reação de transgalactosilação ocorre uma rápida diminuição da concentração da lactose e com o passar do tempo de reação, a concentração de GOS diminui, enquanto a concentração de galactose aumenta, indicando que transgalactosilação é predominante no início da reação. A quantidade de GOS formada sofre influência conforme a fonte e concentração da enzima, o tempo de reação, a temperatura e o pH do processo, a concentração inicial de lactose e a presença de inibidores ou ativadores específicos para a enzima (MANERA, 2010).

A Figura 2.4 representa as duas etapas da reação de hidrólise da lactose por β -galactosidase, onde na primeira etapa ocorre a formação do complexo enzima-galactosil e a liberação simultânea da glicose. Já na segunda etapa, o complexo enzima-galactosil é transferido a um aceptor que contém um grupo hidroxila. A β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* possui dois resíduos de ácido glutâmico (Glu⁴⁸² e Glu⁵⁵¹), agindo como doador de prótons e nucleófilo, respectivamente. Em solução diluída de lactose, a água é mais competitiva como aceptor que outros açúcares como glicose e lactose, e a galactose formada é liberada do sítio ativo. Entretanto, em solução com elevada concentração de lactose, a molécula de lactose tem mais possibilidade de agir como

ceptor, se ligando com o complexo enzima-galactose para a formação de oligossacarídeos (LISBOA, 2008; TOMAL et. al., 2010).

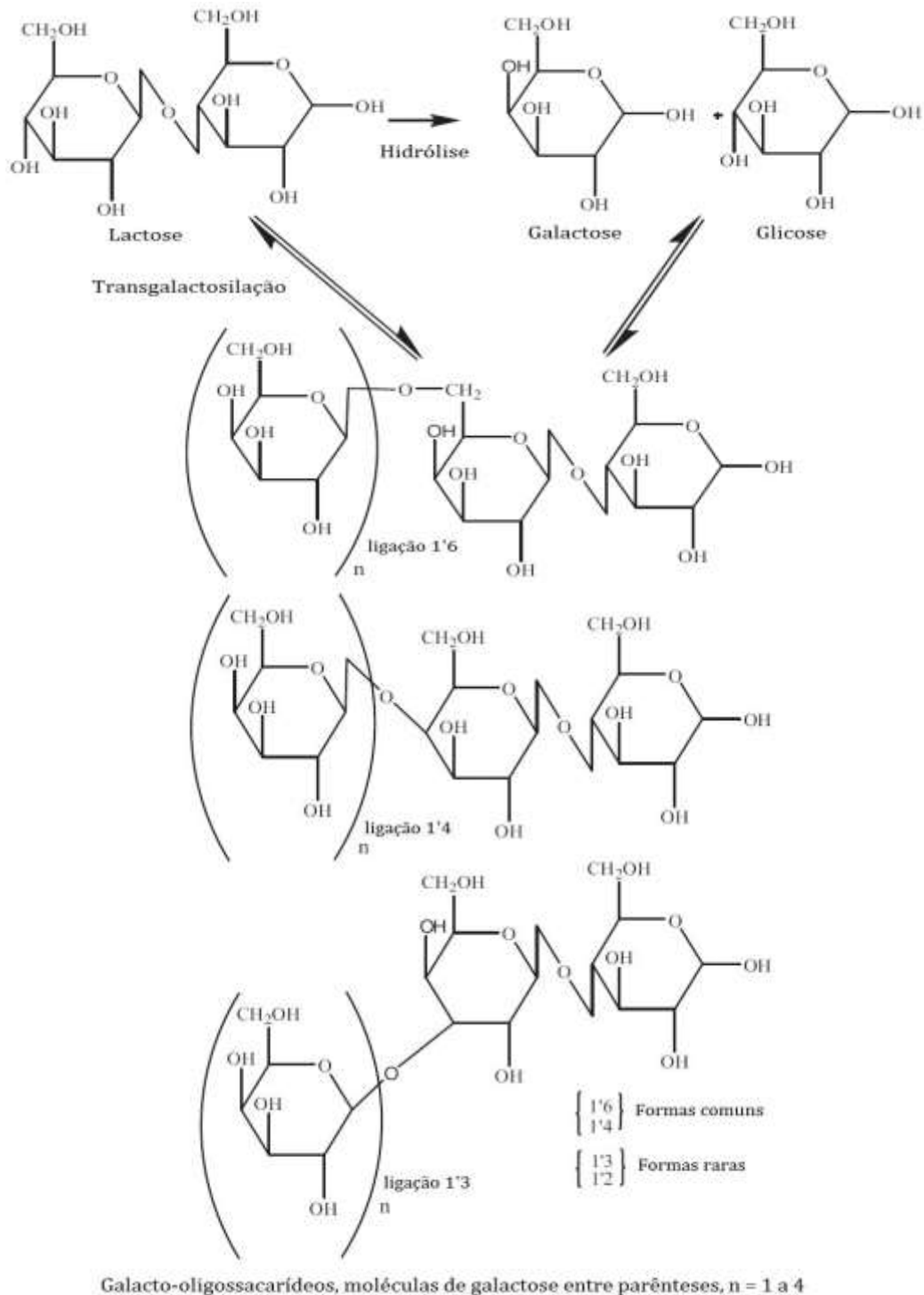


Figura 2.3: Esquema dos processos de hidrólise e transgalactosilação da enzima β -galactosidase para a produção de diferentes GOS (adaptada de Otieno, 2010).

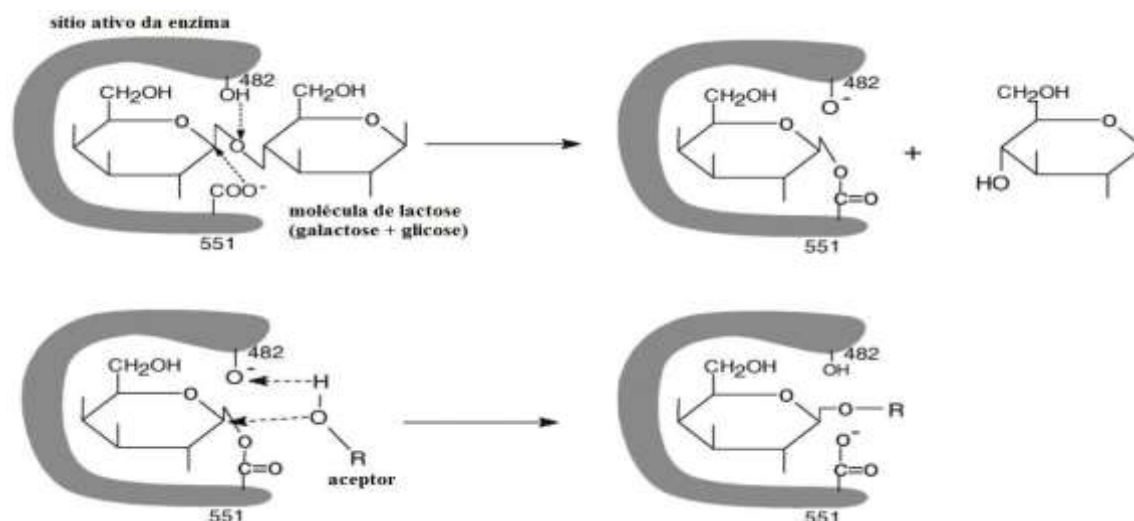


Figura 2.4: Mecanismo de reação de hidrólise e de transgalactosilação da lactose pela β -galactosidase (LISBOA 2008, MANERA, 2010).

2.5.2. Hidrólise Enzimática da Lactose

Um dos principais problemas da utilização do soro de queijo deve-se ao teor de lactose. Logo, algumas das vantagens da hidrólise da lactose são: a não formação de cristais em alguns produtos lácteos (doce de leite, leite condensado, leite concentrado congelado, sorvetes e iogurtes) a baixas temperaturas, maior doçura, melhor digestibilidade, aumento da solubilidade, maior pressão osmótica, menor viscosidade (CAMPOS et. al., 2009). Dessa forma, os problemas relacionados à utilização do soro de queijo são resolvidos, evitando assim os graves problemas ambientais provocados pelo seu descarte (OVSEJEVI, GRAZÚ, VIEIRA, 1998). O principal benefício da redução da lactose é o consumo de produtos por pessoas com intolerância, problema que atinge cerca de 70 % da população mundial (MATIOLI, MORAES, ZANIN, 2003; TREMARIN, 2007). A intolerância à lactose consiste em uma incapacidade para digerir completamente a lactose, que é o açúcar predominante do leite, devido à ausência ou baixa concentração da enzima β -galactosidase, comumente chamada lactase, no intestino delgado.

Existem duas formas para que seja realizada a hidrólise enzimática da lactose no leite, uma é esterilizando o leite cru, e adicionando a lactase após o resfriamento do leite, a segunda maneira é pasteurizando o leite cru, e adicionando a lactase também após o resfriamento do leite, com a hidrólise ocorrendo no tanque de armazenamento (CAMPOS et. al., 2009). Para a escolha do método apropriado, alguns fatores interferem, como:

natureza do substrato, a utilização do produto final, a necessidade das condições sanitárias e o custo do processo (GEKAS; LÓPEZ-LEIVA, 1985).

A enzima β -galactosidase da levedura *Kluyveromyces lactis* é uma das mais importantes utilizadas comercialmente na hidrólise da lactose, sua faixa de pH ótima fica entre 6,9 e 7,3, e temperatura próxima a 35 °C. Campos e colaboradores (2009) estudaram a hidrólise da lactose em baixas temperaturas, isso porque a temperatura de 4 °C é a mais importante para a conservação do leite sob aspecto microbiológico. Para isso, foram testadas sobrecargas de enzima, além da enzima adicionada inicialmente, concentrações de enzima foram adicionadas de tempos em tempos. Assim, a porcentagem de lactose hidrolisada foi semelhante à hidrólise na temperatura ótima da enzima (35 °C), em tempos de reações próximos. Logo, a utilização de baixas temperaturas na hidrólise da lactose torna-se possível devido à sobrecarga de enzima, sendo essa temperatura mais viável para a indústria, pois garante a qualidade microbiológica do leite.

Na hidrólise, a lactose se converte em uma mistura isomolecular de glicose e galactose. Porém na prática, dependendo das condições, essa mistura não é alcançada porque a galactose pode polimerizar ou se unir à lactose para formar oligossacarídeos (TREMARIN, 2007). Na Tabela 2.4 apresenta-se algumas aplicações da lactose hidrolisada.

Tabela 2.4: Aplicações e vantagens da hidrólise enzimática da lactose. Fonte: MATIOLI (1991).

Aplicações	Vantagens
Pão	A lactose serve de substrato para a fermentação das leveduras no processo de fabricação, e para a obtenção de melhor qualidade da crosta e da cor.
Iogurte	A lactose adicionada antes da fermentação aumenta a doçura final do produto, apresenta melhor textura, aroma, maior digestibilidade e desenvolvimento mais rápido de acidez com menor tempo de coagulação.
Queijo fresco	Redução no tempo de coagulação, formação de coágulo mais firme e elástico, ausência de cristalização e aumento da doçura.
Queijo maturado	Maior acidificação, desenvolvimento mais rápido do “flavor”.

CAPITULO III

MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo está descrita toda a metodologia experimental utilizada e os equipamentos analíticos empregados para atingir o objetivo deste trabalho.

3.1. Materiais

Os materiais utilizados neste trabalho foram:

- ✓ Enzima β -galactosidase comercial de *Kluyveromyces lactis* Lactozym 2600L, Novozymes adquirida da Sigma-Aldrich.
- ✓ Soro de queijo em pó fornecido pela empresa Cargil S/A.
- ✓ Padrão HPLC Supelco ALFA-LACTOSE MONOHIDRATA
- ✓ Padrão HPLC Supelco D-(+) GLICOSE
- ✓ Padrão HPLC Fluka GALACTOSE
- ✓ Os demais reagentes foram de grau analítico P.A.

3.2. Equipamentos

Os equipamentos utilizados no desenvolvimento deste trabalho foram:

- ✓ Espectrofotômetro UV-VIS, marca SHIMADZU, modelo UV-1601PC;
- ✓ pHmetro TECNAL, modelo TEC-2;
- ✓ Agitador de tubos PHOENIX AT 56;
- ✓ Banho termostático Dubnoff Tecnal TE-053;
- ✓ Balança analítica METTLER AE200;
- ✓ Balança semi-analítica METTLER PM400;
- ✓ Incubadora rotatória Tecnal TE 421;
- ✓ Cromatógrafo líquido de alta performance (HPLC), marca GILSON, equipado com detector UV/VIS-152;
- ✓ Coluna para CLAE SUPELCOGEL CA (9 μ m, 30cm X 7.8mm);
- ✓ Pré-coluna SUPELCOGEL CA (9 μ m, 5cm X 4.6mm);
- ✓ Reator batelada com camisa de vidro, volume de 50 mL;

3.3. Métodos

3.3.1. Caracterização do soro de queijo em pó

Primeiramente foi feita a caracterização do soro de queijo, realizando as análises em triplicata para umidade, cinzas, gordura, proteína e lactose.

3.3.1.1. Umidade

O teor de umidade do soro de queijo foi determinado pelo método de AOAC (2005).

Inicialmente os béqueres foram tarados permanecendo na estufa a 105 °C por 2 horas. Em seguida, os mesmos foram colocados em dessecador até atingir a temperatura ambiente. Após, pesou-se cerca de 5,0 gramas da amostra no béquer previamente tarado.

A amostra foi colocada em estufa a 105 °C por 4 horas, pesou-se o béquer. Esse procedimento foi repetido a cada 30 minutos até massa constante.

A umidade foi calculada pela equação (1):

$$\text{Umidade (\%)} = \left(\frac{m_3 - m_1}{m_2} \right) * 100 \quad (1)$$

Onde:

m_1 = massa do béquer (grama)

m_2 = massa da amostra (grama)

m_3 = massa final (béquer + amostra) (grama)

3.3.1.2. Cinzas

O teor de cinzas foi determinado pelo método AOAC (2005).

Primeiramente os cadinhos foram tarados, permanecendo na mufla por 4 horas à temperatura de 500 °C a 550 °C.

Pesou-se cerca de 3,0 gramas da amostra de soro de queijo no cadinho previamente tarado. Os mesmos foram levados à mufla (500-550 °C) por 4 horas ou até a obtenção da amostra na cor cinza claro ou branco. Os cadinhos foram resfriados em dessecador.

O teor de cinzas foi calculado pela equação (2):

$$\text{Cinzas (\%)} = \left(\frac{m_3 - m_1}{m_2} \right) * 100 \quad (2)$$

Onde:

m_1 = massa do cadinho (grama)

m_2 = massa da amostra (grama)

m_3 = massa final (cadinho + amostra)(grama)

3.3.1.3. Proteína

O teor de proteína foi determinado utilizando o método de Kjeldahl (AOAC, 2005). O fator de conversão utilizado foi 6,38. O esquema está mostrado na Figura 3.1.

Pesou-se 1,0 grama de soro de queijo em pó em papel seda e transferiu-se para o balão de Kjeldahl (1) (papel + amostra). Adicionou-se 25 mL de ácido sulfúrico e cerca de 6 gramas da mistura catalítica (dióxido de titânio anidro, sulfato de cobre anidro e sulfato de potássio anidro, na proporção 0,3:0,3:6). Em seguida, levou-se a solução para o aquecimento na capela, até que a mesma tornou-se azul-esverdeada e livre de pontos pretos (material não digerido). Após esse ponto a solução permaneceu em aquecimento por mais 1 hora, resfriando posteriormente. Após resfriada, a solução foi transferida para um balão de destilação (2), onde foram adicionadas 10 gotas de fenolftaleína e 1,0 grama de zinco em pó, para ajudar a clivagem das moléculas grandes de proteína. O sistema de destilação foi ligado e a extremidade inferior do condensador (3) foi mergulhado em 25 mL de ácido bórico 0,033 M, contido em Erlenmeyer (4) (500 mL) com 3 gotas do indicador vermelho de metila. Por fim, titulou-se a solução de hidróxido de amônio com a solução de ácido sulfúrico 0,05 M utilizando vermelho de metila.

O teor de proteína foi calculado pela equação (3):

$$\text{Proteína Bruta (\%)} m/m = \left(\frac{V * 0,14 * f}{P} \right) \quad (3)$$

Onde

f = fator de conversão (6,38)

P = massa da amostra (gramas)

V = volume de ácido sulfúrico 0,05 M gasto na titulação

0,14 = massa de nitrogênio para 0,1 N.

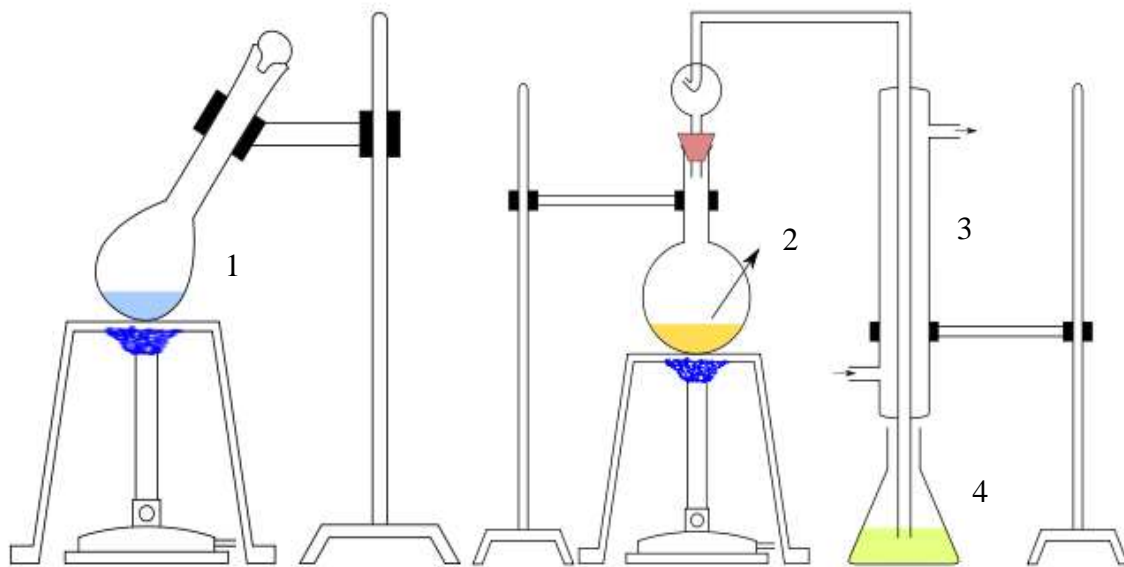


Figura 3.1: Modelo esquemático do método de Kjeldahl para determinação de proteína.

Onde:

- 1 – Balão de Kjeldahl
- 2 – Balão de destilação contendo a solução do balão de Kjeldahl depois da digestão
- 3 – Condensador
- 4 – Erlenmeyer com volume conhecido do ácido padrão (ácido bórico)

3.3.1.4. Gordura

A gordura (lipídeos totais) presente no soro de queijo em pó foi determinada segundo metodologia proposta por Roese-Gottlieb (AOAC, 2005).

A amostra foi inicialmente tratada com hidróxido de amônio e álcool. Com o álcool ocorre a precipitação da proteína que se dissolve no hidróxido, facilitando a extração das gorduras com uma mistura de éteres.

Inicialmente pesou-se entre 4 a 5 gramas do soro de queijo em pó em um béquer e dissolveu-se a amostra com 10 mL de água destilada. Adicionou-se 2 mL de hidróxido de amônio e aqueceu-se em banho-maria por 20 minutos a 60 °C, agitando a mistura. Em seguida, a mistura foi transferida para um funil de separação e resfriada. Primeiramente adicionou-se 10 mL de álcool, agitou-se a mistura e em seguida, adicionou-se 25 mL de

éter agitando por um minuto. Posteriormente foi adicionado éter de petróleo e agitado novamente. A mistura foi deixada em repouso até a ocorrência da separação das fases. A fase inferior foi transferida para um funil de separação e a fase com o éter foi transferida para um béquer previamente tarado. Foi realizada nova extração da fase aquosa utilizando 15 mL de cada éter por duas vezes, juntou-se os extratos em um béquer. Lavou-se o funil de separação e a tampa com partes iguais dos éteres e juntou-se novamente os extratos. Os solventes foram completamente evaporados na capela com o auxílio de banho-maria e, o béquer contendo a gordura foi levado à estufa a 100 °C, resfriado posteriormente em dessecador até massa constante.

O teor de lipídeos foi calculado pela equação (4):

$$\text{Gorduras totais (\%)} m/m = \left(\frac{100 * N}{P} \right) \quad (4)$$

Onde,

N = massa de gordura extraída (gramas)

P = massa de amostra pesada (gramas)

3.3.1.1. Lactose

Os carboidratos foram calculados pelo método das diferenças, e a lactose pelo método DNS (MILLER, 1959) modificado pelo Laboratório Berkeley (açúcares redutores) (ZANIN e MORAES, 1987).

3.3.2. Determinação da concentração de glicose

A concentração de glicose medida durante a reação da hidrólise da lactose foi realizada pelo método de GOD-PAD, utilizando o kit enzimático colorimétrico da Bioliquid (TRINDER, 1969).

3.3.3. Teor de proteína da enzima

O teor de proteína da enzima β -galactosidase (LACTOZYM 2600 L (U/mL) foi determinado pelo método colorimétrico do azul de Coomassie (BRADFORD, 1976). O teor de proteína medido foi igual a 12,48 mg/mL de solução, que corresponde a uma diluição da enzima de 1:200.

3.3.4. Determinação da atividade enzimática

A atividade enzimática foi determinada pelo método das velocidades iniciais. A solução tampão utilizada foi a recomendada pela NOVO INDUSTRI S/A (NOVO, 1979 e MATIOLI, MORAES e ZANIN, 2001) , que contém a mesma concentração dos principais minerais encontrados no leite de vaca. Foi usado benzoato de sódio 0,5 % como conservante. A composição do tampão está mostrada na Tabela 3.1.

Tabela 3.1: Composição da solução tampão. Fonte: NOVO (1979); MATIOLI, MORAES e ZANIN (2001).

Reagentes	mmol/litro
Citrato de $\text{Na}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$	2,70
Ácido Cítrico . H_2O	7,91
K_2SO_4	1,03
K_2HPO_4	2,99
KH_2PO_4	10,80
KOH	19,43
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	4,08
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	5,10
NaOH 4N	10,00
NaHCO_3	3,33

3.3.4.1. Método das Velocidades Iniciais

A atividade enzimática foi determinada pelo método das velocidades iniciais em reator batelada com agitação magnética (Figura 3.1) (MATIOLI, MORAES e ZANIN, 2001). As amostras eram retiradas do reator de tempo em tempo, acompanhando a conversão de lactose em glicose e galactose, fazendo-se a regressão linear entre a glicose produzida (μmoles) e o tempo de reação (minutos).

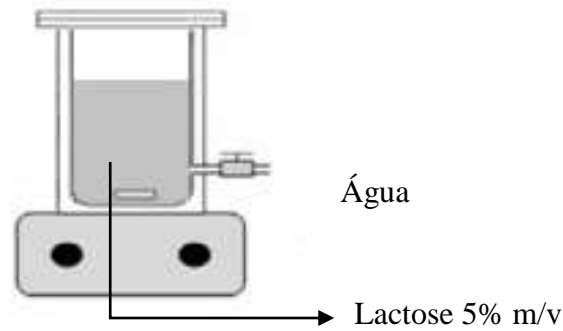


Figura 3.2: Esquema de um reator batelada.

A glicose produzida foi calculada pela equação (5):

$$GP = ([G] - [G_1]) * \frac{V_r}{M_g} \quad (5)$$

Onde:

GP = concentração de glicose produzida (micromoles).

[G] = concentração de glicose na amostra no tempo 't' (mg/mL).

[G₁] = concentração inicial de glicose (mg/mL).

V_r = volume da reação do tempo 't' (mL).

M_g = massa molecular da glicose (0,18 mg de glicose/micromol).

A atividade enzimática foi calculada a partir da equação (6):

$$ATIVIDADE (U. mL^{-1}) = \frac{\mu\text{moles de glicose}}{\text{tempo} * V_{enzima}} \quad (6)$$

Onde,

V_{enzima} = volume da enzima.

E a atividade específica da enzima foi calculada pelo coeficiente angular da curva de glicose em função do tempo, conforme equação (7):

$$A_e = \frac{b_1}{P} \quad (7)$$

Onde:

A_e = atividade específica (U/mg de proteína).

b₁ = coeficiente angular da curva de glicose em função do tempo de reação.

P = proteína utilizada no ensaio (mg).

A determinação da atividade enzimática foi baseada na metodologia proposta por Matioli, Moraes e Zanin (2001).

O soro de leite apresentou uma concentração de 58,5 % de lactose, e desejou-se fazer uma solução de 5 % de lactose, conforme descrito a seguir:

- Pesou-se 8,547 gramas de soro de queijo em um béquer, adicionou-se 50 mL de água destilada e ajustou-se o pH em 6,5 com 10 ml do tampão especial da NOVO e ainda HCL e NaOH 4N para o ajuste final do pH.
- A solução foi transferida para um balão volumétrico de 100 mL e, completou-se o volume com água destilada.
- Em um reator batelada foi adicionada 50 mL da solução de lactose 5 % (m/v) e ajustado a temperatura a 45 °C.
- Após a temperatura ajustada foi adicionado 1,0 mL da solução da enzima na concentração desejada (1:50). Após 15 segundos foi retirada uma amostra de 0,5 mL e adicionada em um tubo de ensaio contendo 1,0 mL de água destilada. O tubo foi tampado e imerso em banho com água fervente por 10 minutos para inativação da enzima. Em seguida, foi resfriado em banho-maria com água à temperatura ambiente. Os tubos foram mantidos a 4 °C até a dosagem de glucose pelo método GOD-PAD.
- Novas amostras foram retiradas de 5 em 5 minutos até completar 30 minutos de incubação.
- A atividade enzimática foi calculada pela equação (6).

3.3.4.1.a. Atividade específica em função do pH e da temperatura:

A atividade específica foi determinada em reator batelada como descrito no item 3.3.4.2. A solução de lactose utilizada foi preparada a 5 % de lactose (m/v), e o teor de proteína da enzima foi de 12,48 mg/ml de solução, utilizando uma diluição da enzima de 1:50.

A faixa de pH testada foi de 6,0, 6,5, 7,0 e 7,5 e a temperatura de 30, 35, 40, 45 e 50 °C. Para as soluções com pH de 6,0, 6,5 e 7,0 foi utilizado uma solução tampão (estoque) hidrogênio fosfato dissódico 0,1 M + ácido cítrico 0,1 M, preparado pelo método de McIlvaine (MORITA e ASSUMPCÃO, 2007). Para a solução de pH 7,5 foi utilizado o tampão especial ajustado com NaOH 4 N.

O tempo de incubação da enzima foi diferente para cada temperatura, retirando amostra de 5 em 5 minutos até 30 minutos para as temperaturas de 30 a 45 °C e de 2 em 2 minutos até o total de 12 minutos para a temperatura de 50 °C.

O ensaio foi seguido conforme descrito a seguir (MATIOLI, MORAES e ZANIN, 2001):

- Preparou-se as soluções tampão em todos os pH (6,0, 6,5, 7,0 e 7,5).
- Preparou-se 100 mL de solução de lactose 5 % (m/v) em cada pH.
- Preparou-se uma solução enzimática diluída 1:50.
- Em um reator batelada adicionou-se 50 mL da solução de lactose 5 %, e aquecido o banho até a temperatura desejada. Em seguida, adicionou-se 1,0 ml da solução da enzima, após 15 segundos retirou-se 0,5 mL da amostra e adicionou-se em tubo contendo 1 mL de água, para ser o branco, ou seja, correspondente ao tempo zero.
- Os tubos foram imersos em banho com água fervente por 10 minutos e em seguida resfriada em banho com água à temperatura ambiente.
- As amostras foram mantidas a 4 °C até dosagem de glicose.
- A atividade específica foi calculada pela equação (7).

3.3.4.1.b. Estabilidade térmica da enzima:

Para os testes de estabilidade térmica, seguiu-se o método descrito no item 3.3.4.2, a solução de lactose 5 % (m/v) preparada a partir do soro de leite em pó. As temperaturas de realização do teste foram de 30, 35, 40, 45 e 50 °C. O pH da solução foi ajustado para 6,5.

O experimento seguiu as seguintes etapas (MATIOLI, MORAES e ZANIN, 2003):

- Aqueceu-se o banho para a temperatura desejada, e o banho para a realização do teste a 45 °C.
- No reator a 45 °C foi adicionado 50 mL da solução de substrato e esperado cerca de 5 minutos para a estabilização da temperatura.
- Em um tubo de ensaio foi adicionado 9,8 mL da solução de lactose 5 % (m/v) e 0,2 ml da enzima, para obter uma diluição de 1:50. Essa foi a solução estoque, que foi incubada nas temperaturas estudadas.

- Foi retirado 1,0 mL da solução contida no tubo e adicionado ao reator já com a solução de substrato, essa foi a atividade inicial da enzima.
- O tubo contendo a solução estoque foi incubado no banho na temperatura de teste desejada e em seguida, foi acionado o cronômetro. Amostras de 1,0 mL foram retiradas de 40 em 40 minutos, até completar um total de 240 minutos, e a atividade foi determinada a 45 °C, como descrito no item 3.3.4.2.
- A atividade específica da enzima foi calculada pela equação (7).

3.3.5. Síntese de Galacto-oligossacarídeos

A metodologia utilizada para a síntese foi a proposta por Lisboa e colaboradores. (2012). As reações de síntese enzimática de galacto-oligossacarídeos (GOS) foram realizadas em incubadora rotatória a 180 rpm. As temperaturas testadas foram 30, 35, 40, 45 e 50 °C. A solução de soro de queijo foi preparada com solução tampão fosfato de sódio 0,1 M (pH 6,5), nas concentrações de 10, 20 e 30 % de lactose. O volume final da reação foi de 125 mL, e a solução de soro de queijo completada para esse volume com a adição da enzima nas diluições de teste (5, 7,5 e 10 U/mL).

A síntese foi mantida por 12 horas, as amostras de 5 mL retiradas a cada 2 horas, incluindo o tempo zero. As amostras foram inativadas a 100 °C por 5 minutos e em seguida armazenadas em freezer até a identificação e quantificação dos açúcares por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Com a síntese de GOS foi estudada a influência da temperatura, concentração da enzima e concentração de lactose, na produção de GOS, bem como a produtividade, rendimento e conversão máxima de lactose. Os valores foram determinados pelas equações (8), (9) e (10) (HSU, LEE e CHOU, 2007).

$$\text{Conversão da lactose (\%)} = \frac{Lac_{Inicial} (g.L^{-1}) - Lac_{Residual} (g.L^{-1})}{Lac_{Inicial} (g.L^{-1})} * 100 \quad (8)$$

$$\text{Rendimento (\%)} = \frac{GOS (g.L^{-1})}{Gli + Gal + Lac + GOS (g.L^{-1})} * 100 \quad (9)$$

$$\text{Produtividade} = \frac{\Delta GOS (g.L^{-1})}{\Delta \text{Tempo (horas)}} \quad (10)$$

Onde:

Gal = concentração de galactose (g/L)

Gli = concentração de glicose (g/L)

Lac = concentração de lactose (g/L)

Lac_{inicial} = lactose inicialmente presente no substrato (g/L)

Lac_{residual} = lactose presente no substrato (g/L)

GOS = concentração de galacto-oligossacarídeos (g/L)

Δ GOS = variação da concentração de galacto-oligossacarídeos (g/L)

Δ Tempo = variação do tempo (horas)

3.3.6. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Os produtos obtidos foram analisados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), utilizando uma coluna SupelcogelTM Ca (300 x 7,8mm). Foi utilizada água ultra pura como solvente a um fluxo de 0,5 mL/min a 65 °C. Foram aplicados 20 μ L das amostras e das soluções padrões, preparadas a 0,5 % (m/v). O método para a análise cromatográfica foi adaptado de Santos (2006). Os carboidratos foram detectados pelo índice de refração e identificados por comparação com o tempo de retenção dos padrões de glicose, galactose, lactose.

3.3.6.1. Curva padrão

A curva de calibração foi construída utilizando os padrões de glicose, galactose e lactose (Sigma-Aldrich). Foram preparadas soluções contendo os três padrões numa faixa de concentração de 0,16 a 3 g.L⁻¹.

3.3.6.2. Amostras

A identificação e quantificação dos açúcares foi realizada pela comparação dos picos das amostras padrão e o tempo de corrida. As diluições das amostras para a análise cromatográfica foram as mostradas na Tabela 3.2.

Tabela 3.2: Diluição da solução para a identificação e quantificação dos açúcares no CLAE.

CONCENTRAÇÃO DE LACTOSE	DILUIÇÃO	
	LACTOSE	GLICOSE/GALACTOSE/GOS
10%	1:6 (v/v)	1:3 (v/v)
20%	1:50 (v/v)	1:5 (v/v)
30%	1:100 (v/v)	1:6 (m/v)

Inicialmente foi realizada a diluição para leitura da glicose, galactose e GOS, e em seguida, a diluição para determinação da lactose, utilizando como solução inicial a amostra já diluída anteriormente. A Figura 3.2 mostra os cromatogramas de um ensaio, onde é possível observar que inicialmente (1ª diluição) são visíveis somente os picos de galactooligosacarídeos, galactose e glicose. Assim, após a primeira corrida no cromatógrafo, foi necessário realizar nova diluição na amostra para que o pico de lactose se tornasse visível e fosse possível quantificar. Isso devido às amostras apresentarem alta concentração de lactose.

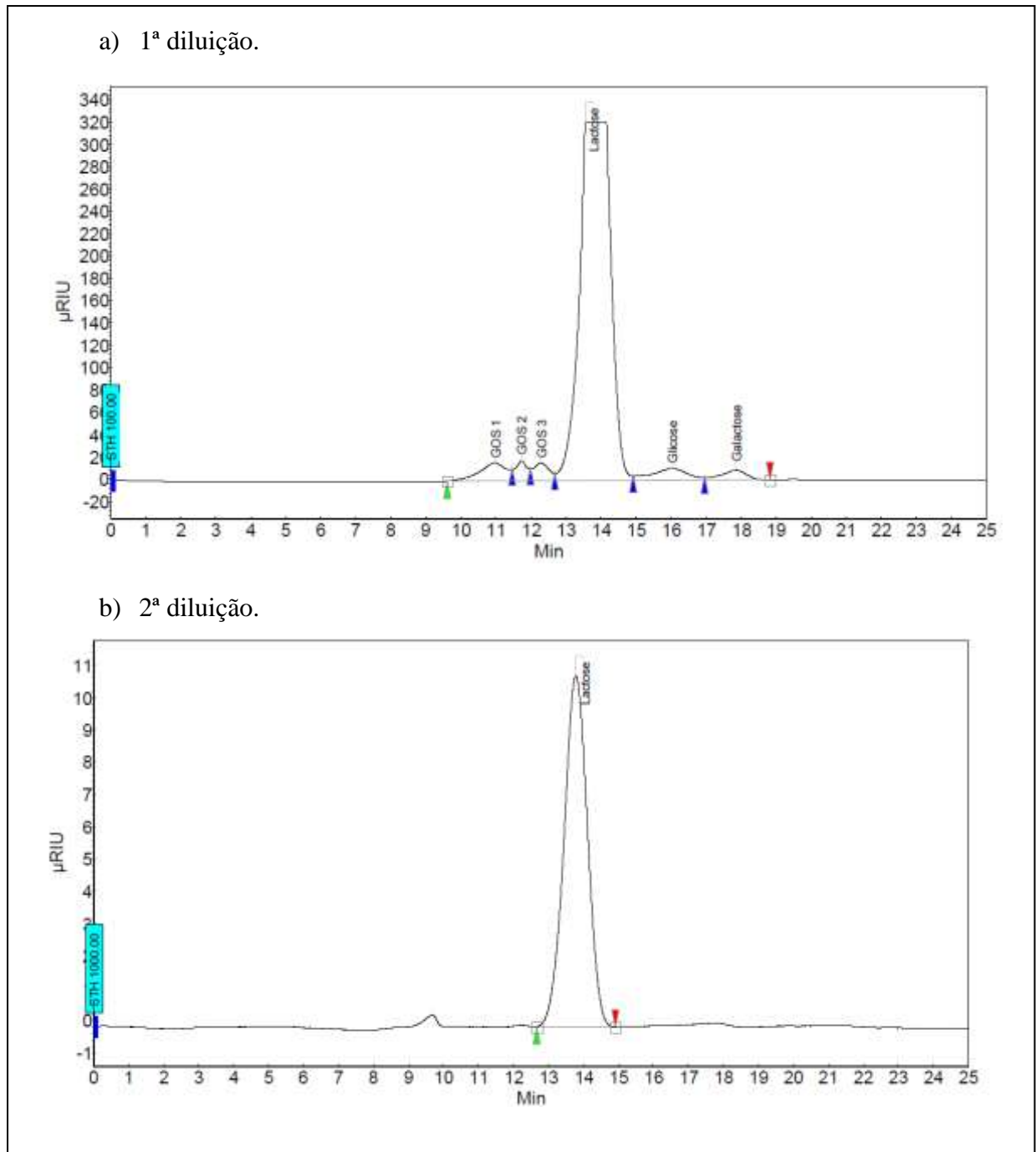


Figura 3.3: Perfil cromatográfico do ensaio a 40 % de lactose, 40 °C, pH 6,5 em 6 horas de reação.

CAPITULO IV

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Caracterização do soro de queijo em pó

O resultado da caracterização do soro de queijo em pó (%) utilizado nos experimentos segue na Tabela 4.1:

Tabela 4. 1: Caracterização química do soro de queijo em pó.

Análises	Valores (%)
Umidade	2,08 % ± 0,03
Cinzas	6,79 % ± 0,01
Proteína	11,97 % ± 0,01
Gordura	1,48 % ± 0,00
Carboidratos	77,68 % ± 0,03

Os carboidratos foram determinados pelo método da diferença, e o teor de lactose encontrado foi igual a 58,5 %. Os resultados condizem com o padrão estabelecido no Codex Alimentarius (versão 2005), que estabelece um valor máximo de 5,0 % (m/m) para a umidade e 9,5 % (m/m) para cinzas, valor mínimo de proteína de 11,0 % (m/m) e os valores de referência de 61,0 % (m/m) de lactose e 2,0 % (m/m) de gordura.

4.2. Atividade enzimática da β -galactosidase:

A atividade de transgalactosilação da enzima β -galactosidase comercial de *Kluyveromyces lactis* (Lactozym[®] 2600 L) foi igual a 1663, 75 U.mL⁻¹.

4.2.1. Atividade específica em função do pH e da temperatura:

Na Tabela 4.2 mostra-se os resultados obtidos para a atividade específica em cada ensaio, enquanto na Figura 4.1 o comportamento da atividade específica em função do pH e da temperatura. Os maiores valores da atividade foram encontrados em pH 6,5 com exceção da temperatura de 50 °C, e os menores resultados foram determinados em pH 7,5, observados na temperatura de 50 °C. Em função da temperatura, os maiores valores de atividade ocorreram em 45 °C, alcançando a atividade máxima igual a 2,67 U/mg de

proteína, obtida em pH 6,5 e 45 °C, coerentemente com os resultados apresentados por Matioli, Moraes e Zanin (2001), que encontraram atividade máxima da enzima (3,12 U/mg de proteína) em pH 6,5 na temperatura de 45 °C, os maiores valores da atividade também foram encontrados em 45 °C. Em relação ao pH também houve coerência, visto que as maiores atividades foram obtidas em pH 6,5. O pH ótimo encontrado foi compatível também com o apresentado por Otieno (2010), que determinou pH 6,5 como o ótimo para essa enzima.

Jurado e colaboradores (2004) em seu estudo sobre enzimas comerciais, concluíram que os valores ótimos de pH e temperatura para a β -galactosidase comercial de *Kluyveromyces lacti* se encontram entre pH 6,5 e 7,0 e 35 e 45 °C, respectivamente. Campello (2010) também estudou a influência do pH e da temperatura para a enzima β -galactosidase comercial de *Kluyveromyces lacti*, encontrando pH ótimo de 6,6 e temperatura ótima de 45 °C, os maiores valores da atividade observados entre 37 e 45 °C, enquanto acima de 45 °C, a atividade sofreu queda acentuada devido à desnaturação da proteína. Gekas & Lopez-Leiva (1985) obtiveram pH ótimo entre 6,9 e 7,3 e temperatura ótima 37 °C, para a mesma enzima.

Os gráficos e as equações das retas de todos os ensaio estão apresentados no Anexo (Capítulo VIII).

Tabela 4.2: Valores da atividade específica da enzima β -galactosidase em função do pH e da temperatura.

Temperatura (°C)	Atividade específica (U/mg de proteína)			
	pH			
	6,0	6,5	7,0	7,5
30	1,3772	1,4101	1,0783	0,912
35	1,9155	2,0218	1,4293	1,1762
40	1,9091	2,3459	1,8970	1,4277
45	1,9292	2,6663	2,0610	1,4514
50	0,9765	0,9968	1,2377	0,8489

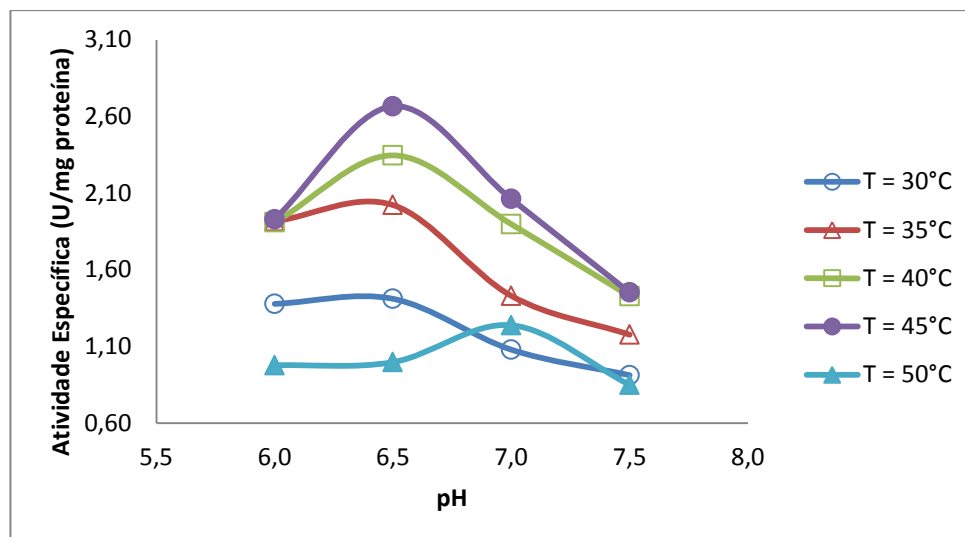


Figura 4.1: Atividade específica em função do pH e da temperatura.

4.2.2. Estabilidade térmica

A Tabela 4.3 mostra os resultados obtidos para a estabilidade térmica e a Figura 4.2, mostra o gráfico do comportamento da estabilidade da enzima em função da temperatura em pH 6,5, onde observa-se que nas temperaturas de 30, 35 e 40 °C a enzima mostrou-se bem estável durante todo o ensaio. Já na temperatura de 45 °C a enzima perdeu 19,44 % de sua atividade após 80 minutos a 50 °C, após 40 minutos estava praticamente inativa. Embora a maior atividade da enzima tenha sido encontrada a 45 °C, a mesma sofreu inativação térmica em pouco tempo nessa temperatura, portanto sua aplicação em longas reações deve ser realizada em temperaturas inferiores a 45 °C.

Os resultados encontrados por Matioli, Moraes e Zanin (2003), também mostraram que apesar da atividade máxima ser encontrada a 45 °C, a temperatura recomendada para processos de longa duração é 40 °C (2,81 U/mg de proteína), por apresentar-se mais estável e com atividade específica apenas 10 % menor que a 45 °C (3,12 U/mg de proteína).

Tabela 4.3: Resultado da estabilidade térmica, valores da atividade da enzima em função da temperatura.

Temperatura (°C)	Atividade específica (U/mg de proteína)						
	Tempo (minutos)						
	0	40	80	120	160	200	240
30	3,75	3,68	3,63	3,67	3,71	3,78	3,72
35	3,86	3,78	3,67	3,63	3,75	3,59	3,80
40	3,97	3,82	3,68	3,82	3,68	3,69	3,49
45	3,76	3,69	3,60	3,19	2,90	2,88	2,90
50	3,71	0,81	0,38	0,13	0,00	0,00	0,00

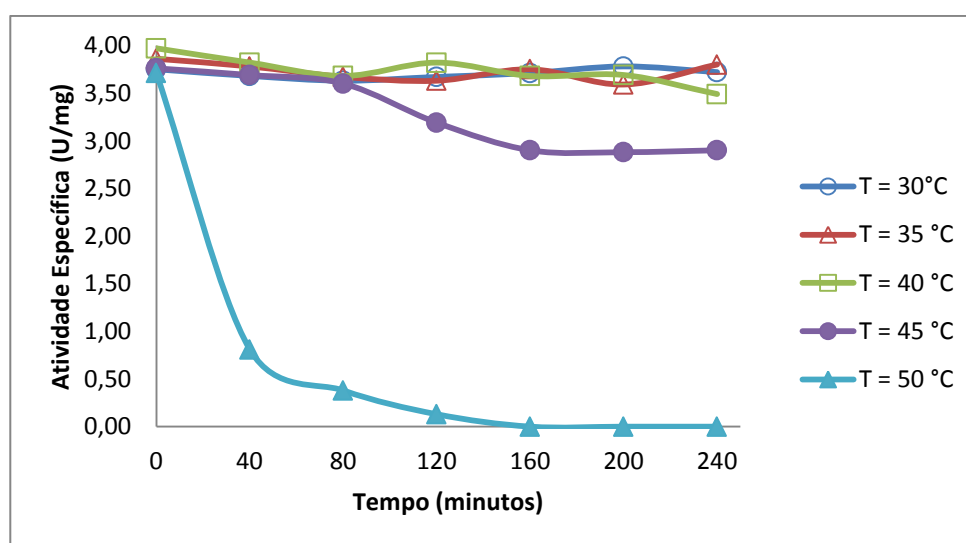


Figura 4.2: Estabilidade térmica em função da temperatura em pH 6,5.

4.3. Síntese de Galacto-oligossacarídeos

4.3.1. Produção de galacto-oligossacarídeos (teste em pH 6,5 e 7)

Testes preliminares foram realizados para determinar qual o melhor pH para a realização da síntese. Foram escolhidos dois valores de pH 6,5 e 7, pois a atividade da enzima foi maior nesses valores. A Figura 4.3 mostra os resultados, indicando que o pH 6,5 apresentou maior concentração de GOS, assim, as demais reações foram todas realizadas no pH 6,5.

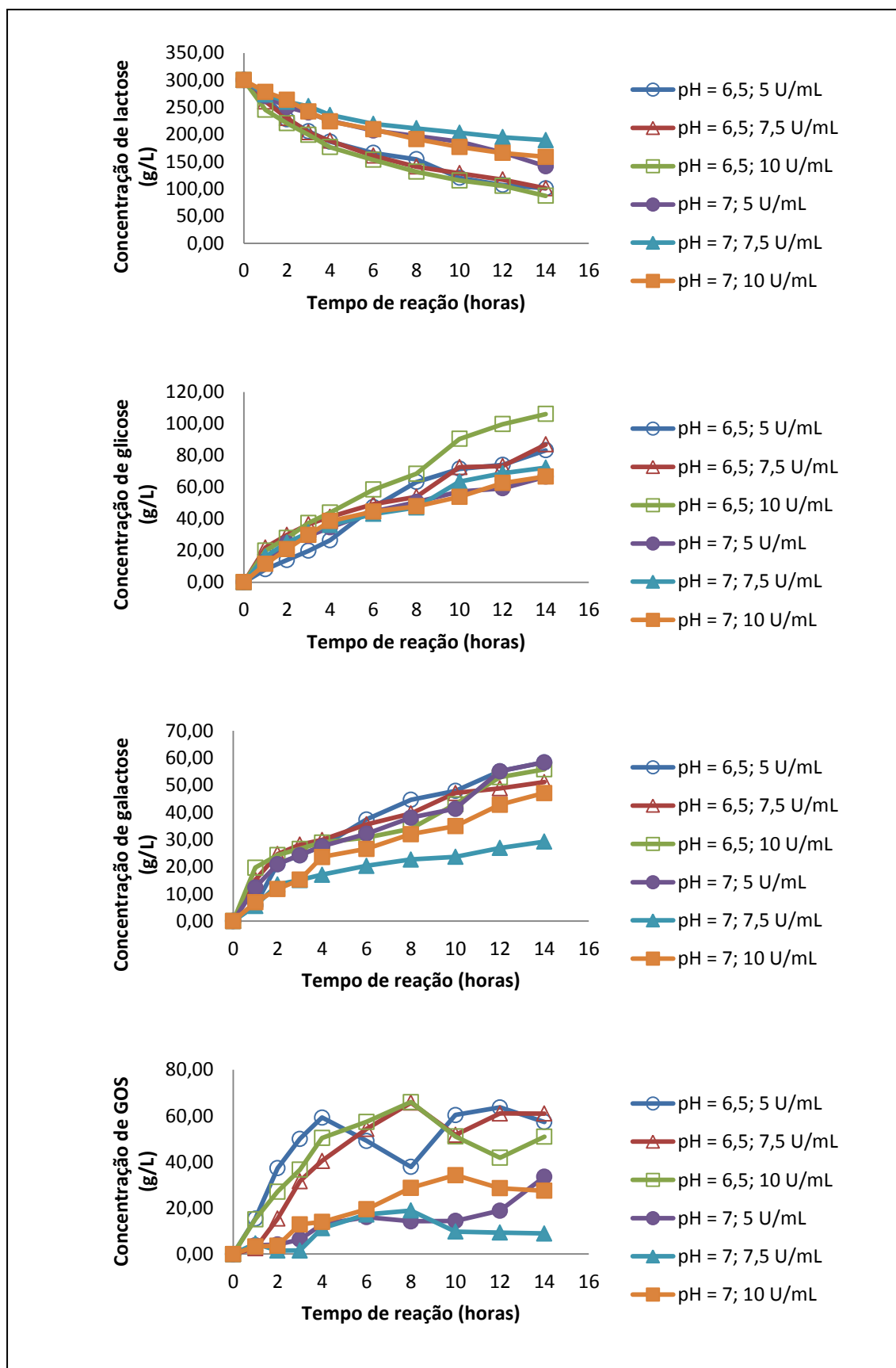


Figura 4. 3: Consumo da lactose e produção de glicose, galactose e galacto-oligossacarídeos ao longo da reação em pH 6,5 e 7,0, temperatura de 40 °C, em diferentes concentrações de enzima.

4.3.2. Produção de galacto-oligossacarídeos (10, 20 e 30 % de lactose)

As Figuras 4.4, 4.5 e 4.6 apresentam os perfis cinéticos dos ensaios da síntese enzimática de GOS a partir de solução de 10 %, 20 % e 30 % de lactose, respectivamente, indicando o consumo de lactose e a produção de glicose, galactose e galacto-oligossacarídeos.

A reação de transgalactosilação foi realizada até 12 horas. Observa-se pelas Figuras 4.4, 4.5 e 4.6 que no tempo inicial de reação não há glicose, galactose e galacto-oligossacarídeos, havendo somente lactose presente no soro.

Observa-se pelas Figuras 4.4, 4.5 e 4.6 que conforme a concentração de lactose do soro diminui, ocorre um aumento na produção de glicose e galactose com o tempo, contudo a concentração de galactose é menor que a concentração de glicose, pois a maior parte dos galacto-oligossacarídeos são formados por duas moléculas de galactose e apenas uma de glicose (LISBOA et. al., 2012).

Tomal e colaboradores (2010) concluíram que altas concentrações de lactose favorecem a reação de transgalactosilação, enquanto baixas concentrações de lactose favorecem a hidrólise da lactose. Assim, tornam-se válidos os picos de galacto-oligossacarídeos (GOS) formados no início da reação (Figura 4.4, 4.5 e 4.6), pois primeiramente ocorre a reação de transgalactosilação com a formação dos galacto-oligossacarídeos devido à alta concentração de lactose, e posteriormente com a diminuição da lactose, ocorre uma diminuição da produção dos galacto-oligossacarídeos e aumento da concentração de glicose e galactose, devido à reação de hidrólise, que é favorecida com a redução da lactose durante a reação. As maiores concentrações de GOS são formadas quando grande parte da lactose já foi hidrolisada, contudo esse fato não coincide com a conversão máxima da lactose.

A maior concentração de GOS foi de 71,45 g/L, com rendimento máximo de 23,82 %, obtendo 27,14 g/L de galactose, 46,13 g/L de glicose, 155,28 g/L de lactose e conversão de lactose igual a 48,24 %, determinada nas condições de 30% de lactose, 40 °C e 10 U/mL de enzima, após 6 horas de reação (Figura 4.6). Ou seja, a maior produção de GOS foi determinada na máxima concentração de enzima e lactose estudada. Não foi possível trabalhar com a concentração de lactose acima de 30 %, devido à dificuldade para sua dissolução.

Martinez-Vilaluenga e colaboradores (2008) encontraram a produção máxima de GOS (aproximadamente 17 %) em 25 % de lactose, 40 °C e pH 6,5 em 2 horas de reação. Lisboa (2008) encontrou 119 g/L de GOS, em 40 % de lactose, 40 °C, 10 U/mL e pH 7,0 em 4 horas de reação. Valero (2009) obteve 31 % de GOS em 50 % de lactose, 35 °C e pH 6,5. Chockchaisawasdee e colaboradores (2005) trabalhando com β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* obtiveram 99 mg/mL de GOS em 40 % de lactose, 5,8 U/mL de enzima, 40 °C, pH 7,0 em 4 horas de reação.

No presente trabalho os resultados obtidos são coerentes com os encontrados na literatura.

As Figuras 4,7, 4,8 e 4,9 mostram os resultados de rendimento, produtividade e conversão de lactose ao longo da reação de galacto-oligossacarídeos.

A conversão máxima de lactose que foi de 76,26 % ocorreu no ensaio a 10 % de lactose, 40 °C e 10 U/mL de enzima, indicando que a hidrólise é favorecida em soluções com menores concentrações de lactose (TOMAL et. al., 2010). O rendimento máximo de GOS igual a 23,82 % foi obtido a 40 °C, 10 U/mL de enzima e 30 % de lactose. A produtividade foi máxima nas primeiras 2 horas igual a 22,53 %, no ensaio a 20 % de lactose, 40 °C e 5 U/mL de enzima, sofrendo contínua redução ao longo da reação. Esse comportamento ocorre devido à inibição da glicose e galactose na formação dos galacto-oligossacarídeos a partir da lactose, conforme proposto por Rustom, Foda e Lopez-Leiva (1998). Alguns estudos obtiveram resultados semelhantes, alcançando produção máxima de GOS no início da reação, devido à atividade de transgalactosilação, enquanto a conversão de lactose aumenta ao longo da reação devido à atividade hidrolítica que é favorecida a baixas concentrações de lactose.

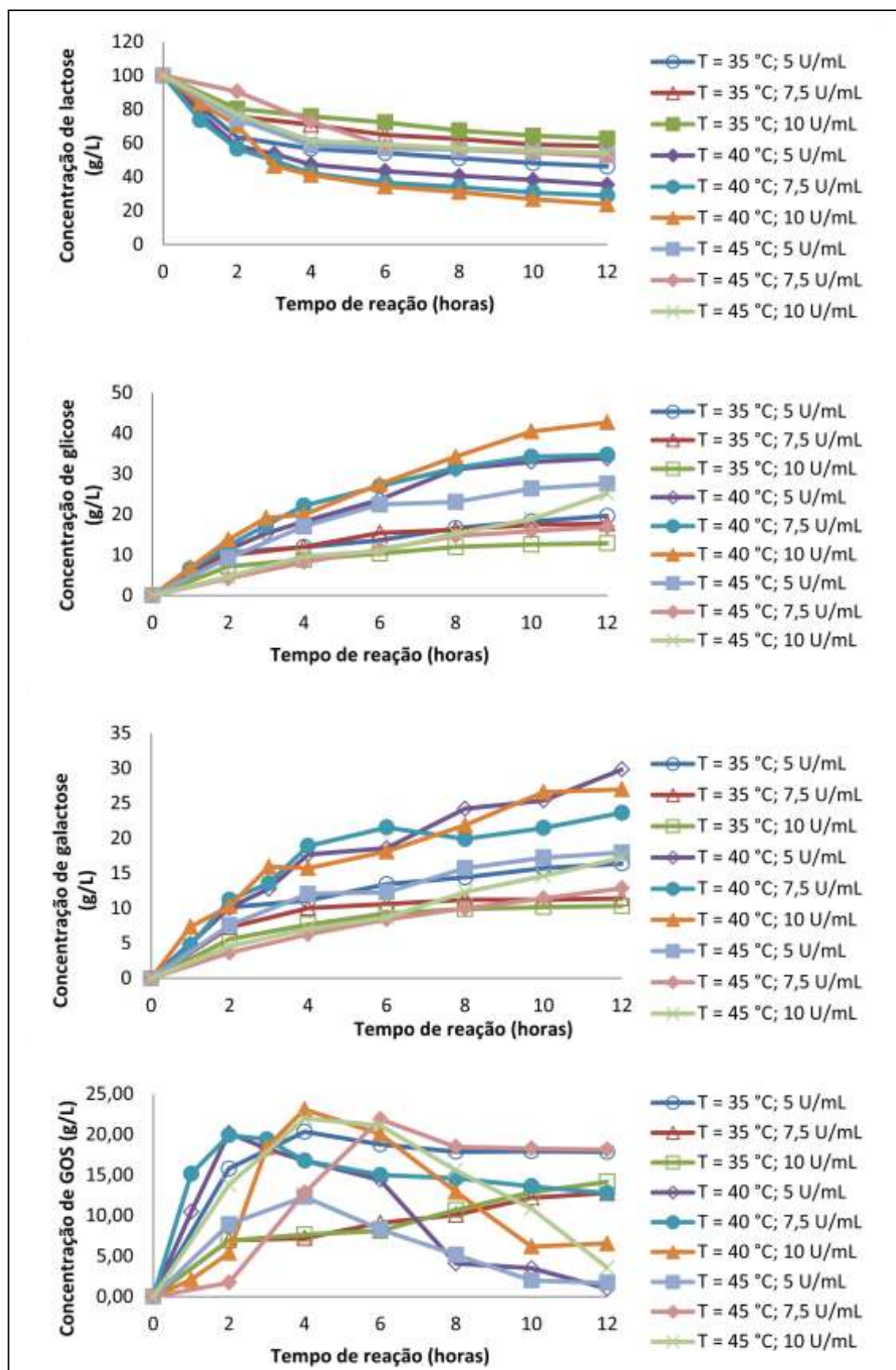


Figura 4.4: Concentração de lactose, glicose, galactose e GOS em função do tempo de reação, com concentração inicial de 10 % de lactose em pH 6,5, em função da temperatura e concentração de enzima.

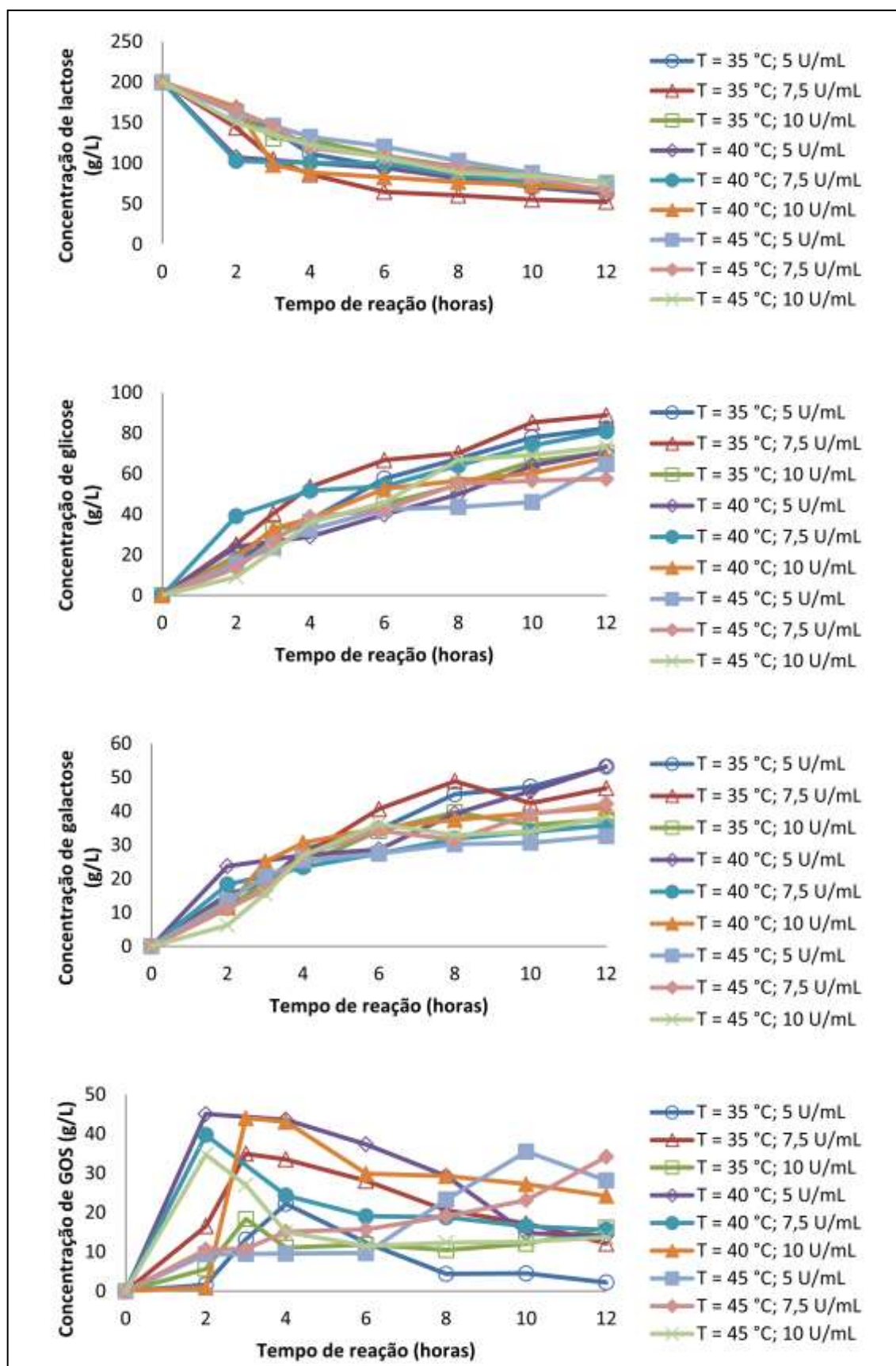


Figura 4.5: Concentração de lactose, glicose, galactose e GOS em função do tempo de reação, com concentração inicial de 20 % de lactose em pH 6,5, em função da temperatura e concentração de enzima.

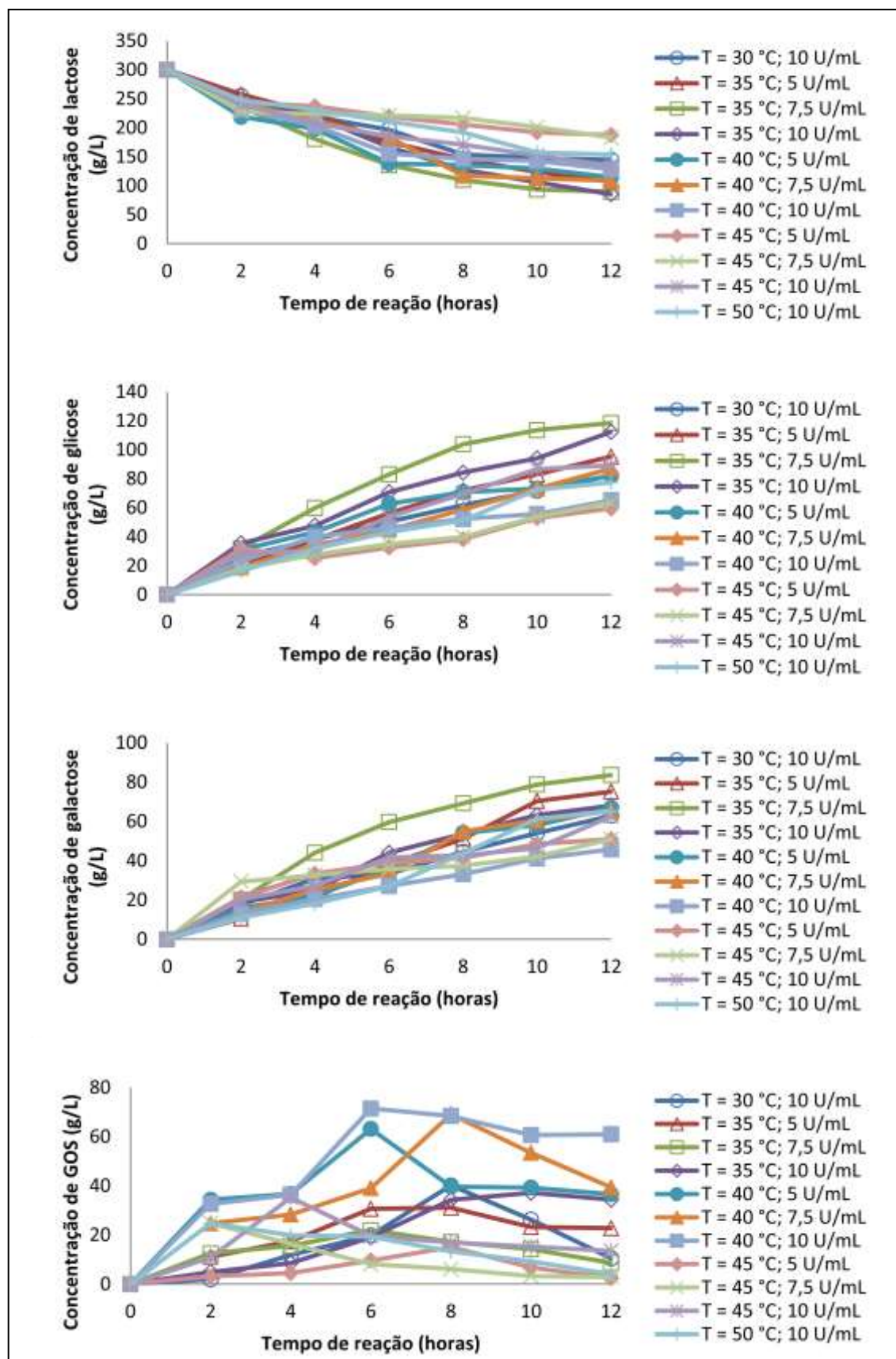


Figura 4.6: Concentração de lactose, glicose, galactose e GOS em função do tempo de reação, com concentração inicial de 30 % de lactose em pH 6,5, em função da temperatura e concentração de enzima.

Lisboa e colaboradores (2012) encontraram conversão máxima de lactose de 87,8 % no ensaio a 20 % de lactose, 10 U/mL e 40 °C. O rendimento máximo de GOS foi de 29,9 % determinado no ensaio a 40 % de lactose, 10 U/mL e 40 °C, em 4 horas de reação onde obtiveram também a concentração máxima de GOS, utilizando a enzima β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis*. Almeida e Pastore (2004) obtiveram concentração máxima de GOS de 21 % em 24 horas de reação, utilizando a enzima β -galactosidase de *Scopulariopsis* sp, na reação a 40 °C, em pH 7,68 e 6 U/mL de enzima, tendo conversão de lactose de 22 %. Chockchaisawasdee e colaboradores (2005) encontraram produção máxima de GOS de 99 mg/mL e 25 g/L.h de produtividade com a enzima β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis*. Manera (2010) estudou a produção de GOS com a enzima β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* e obteve concentração máxima de GOS de 83 g/L, rendimento de 16,5 % e produtividade igual a 27,6 g/L.h, em 3 horas de reação, a 50% de lactose, 10 U/mL de enzima, 45 °C e pH 7,0 obtendo conversão máxima de lactose de 90 %. Santos, Simiqueli e Pastore (2009) estudaram a produção de GOS a partir da β -galactosidase de *Scopulariopsis* sp, obtendo concentração máxima de GOS de 80,8 g/L e 20 % de conversão de lactose em 12 horas de reação a 45 °C, 10 U/mL de enzima e 40 % de lactose. Rustom, Foda e Lopez-Leiva (1998) analisaram a produção de GOS usando permeado de soro de queijo e a enzima β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* obtendo 5,4 % de GOS, 23,5 % de rendimento e grau de hidrólise de 69,5 %, em 3,5 horas de reação com 23 % de lactose, 45 °C, pH 7 e 0,1 % de enzima Lactozym 3000L. Foda e Lopez-Leiva (2000), obtiveram 6,2 % de GOS e 31 % de rendimento em 4 horas de reação utilizando a enzima *Kluyveromyces lactis* (Maxilact® 2000L) com aumento do grau de hidrólise de 87% para 92,9 % com a diminuição da concentração de lactose inicial de 20 para 14 %.

Os resultados encontrados no presente trabalho estão coerentes com o encontrado na literatura. A conversão máxima de lactose foi determinada na menor concentração de lactose trabalhada, enquanto a concentração de galacto-oligossacarídeos e o seu rendimento foram determinados na máxima concentração de lactose trabalhada nessa pesquisa.

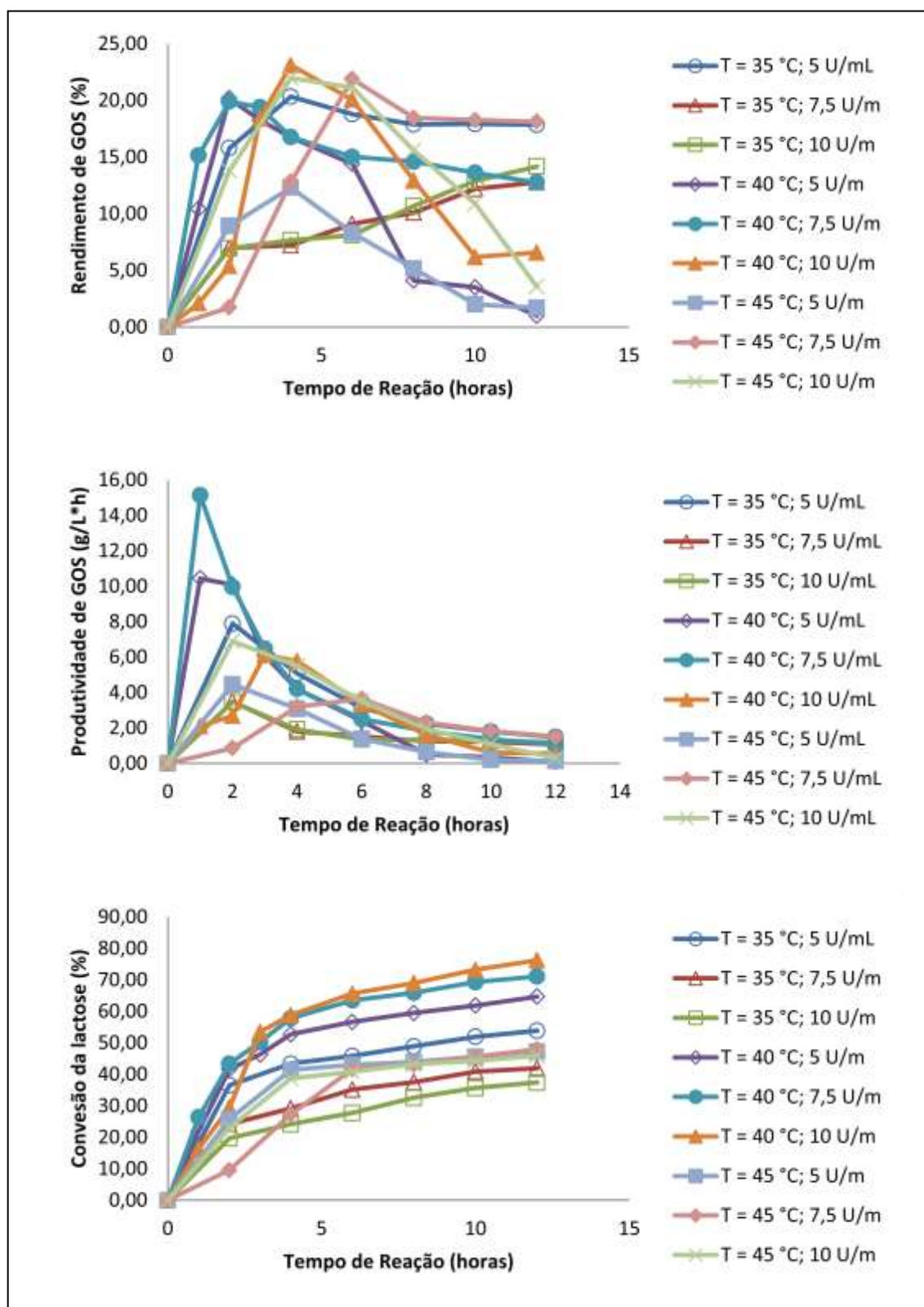


Figura 4.7: Resultados de rendimento e produtividade de GOS e conversão de lactose para os ensaios a 10 % de lactose inicial, pH 6,5 em função da temperatura e concentração de enzima.

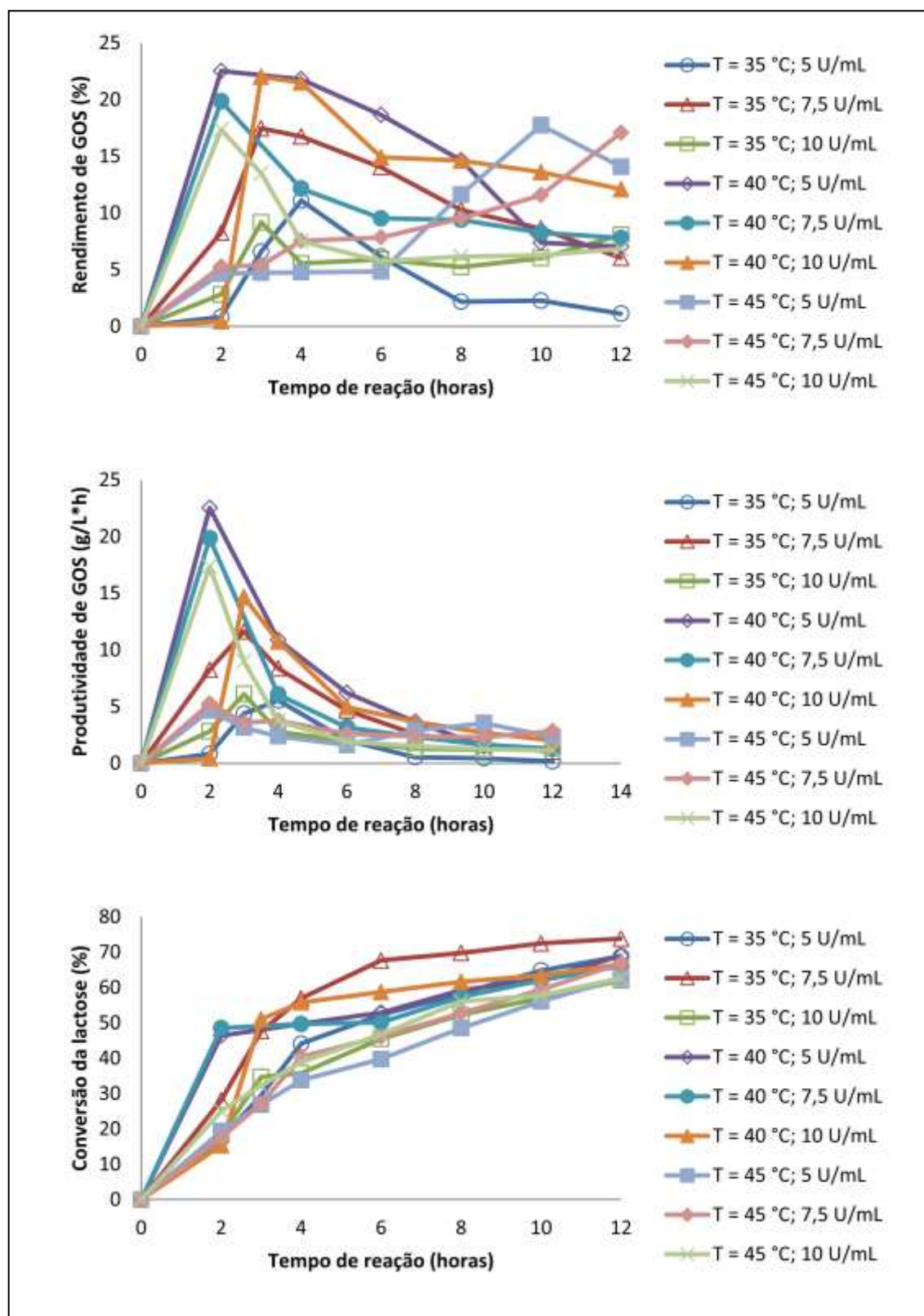


Figura 4.8: Resultados de rendimento e produtividade de GOS e conversão de lactose para os ensaios a 20 % de lactose inicial, pH 6,5 em função da temperatura e concentração de enzima.

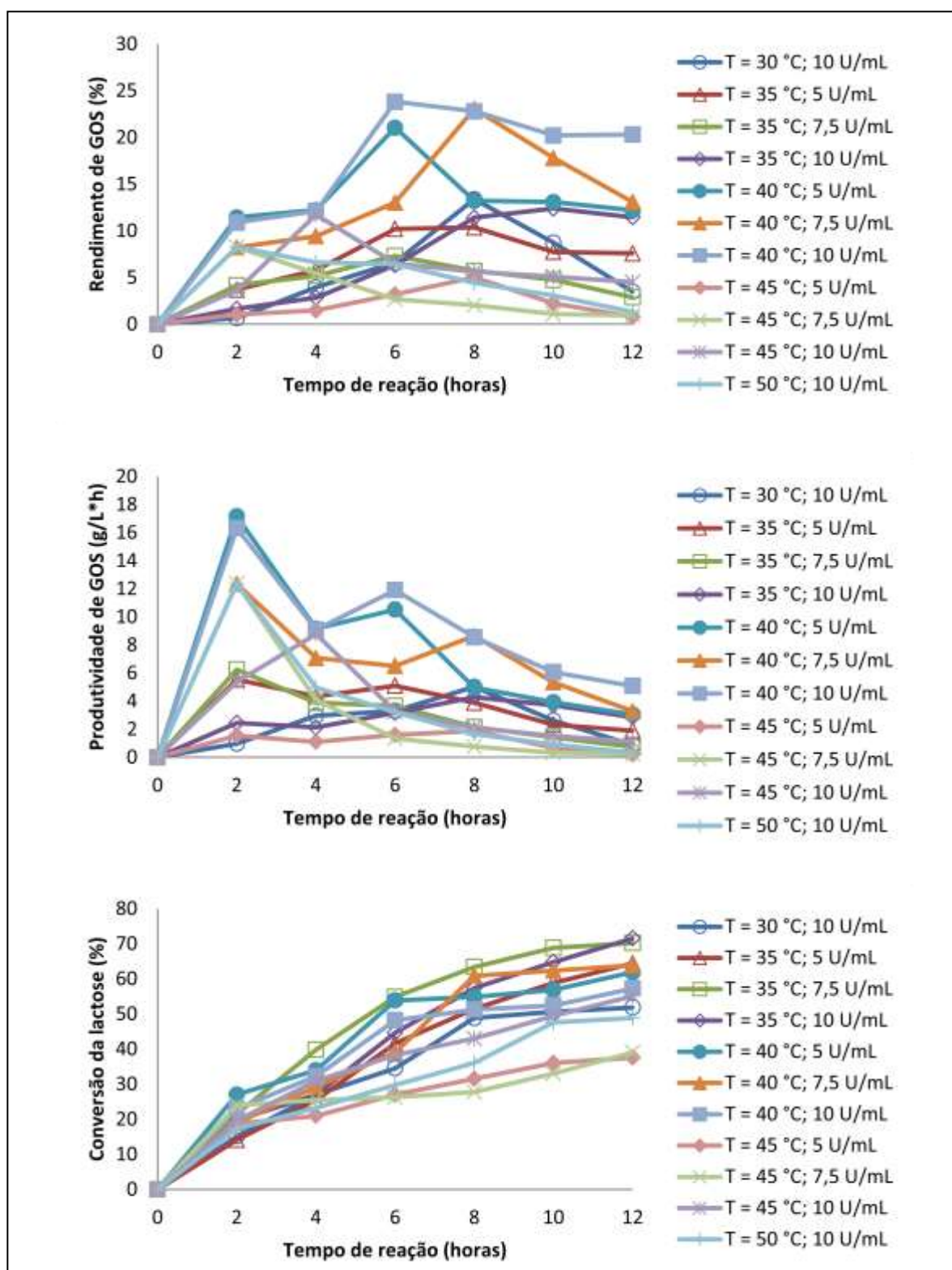


Figura 4.9: Resultados de rendimento e produtividade de GOS e conversão de lactose para os ensaios a 30 % de lactose inicial, pH 6,5 em função da temperatura e concentração de enzima.

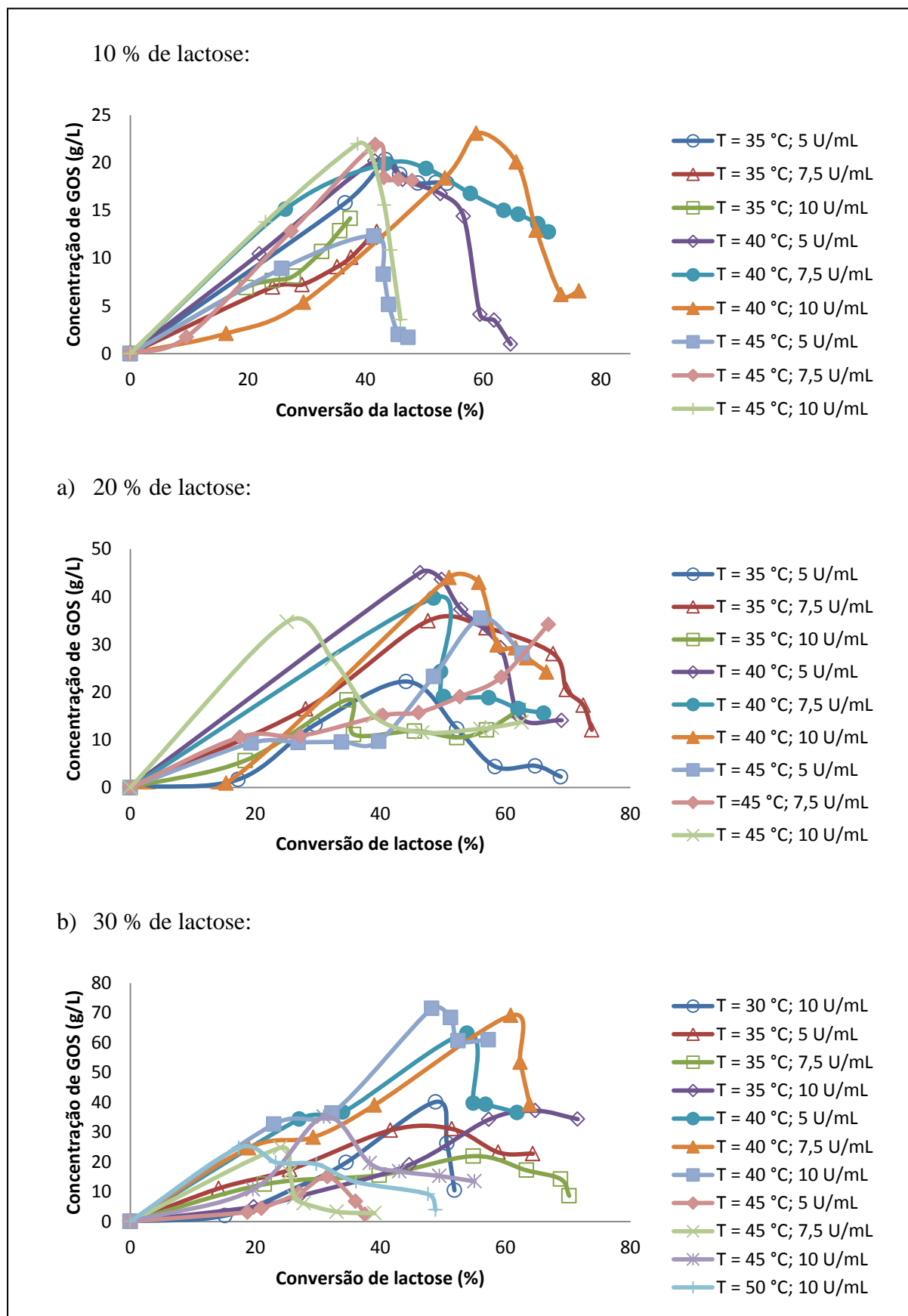


Figura 4.10: Formação de galacto-oligosacarídeos versus conversão de lactose nas diferentes temperaturas, concentrações de enzima e de lactose, no pH 6,5.

A máxima concentração de galacto-oligossacarídeos foi obtida em aproximadamente 50 % de conversão de lactose, resultado semelhante ao encontrado por Colinas e colaboradores (2013). A Figura 4.10 mostra que quanto maior a concentração de lactose maior será o rendimento de galacto-oligossacarídeos. O aumento de 10 % para 30 % de lactose, aumentou a concentração de lactose de aproximadamente 25 g/L para 80 g/L. Contudo, altas concentrações geram um custo alto de produção.

CAPITULO V

CONCLUSÕES

Os principais resultados e conclusões observados nesse trabalho são apresentados a seguir:

- ✓ A enzima β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* Lactozym[®] 2600L apresentou atividade de transgalactosilação igual a 1663,75 U.mL⁻¹.
- ✓ A atividade enzimática ótima em função do pH e da temperatura, para a enzima comercial β -galactosidase *Kluyveromyces lactis* ocorreu em pH 6,5 e temperatura de 45 °C, tendo alcançado 2,67 U/mg de proteína.
- ✓ O ensaio da estabilidade térmica da enzima mostrou que a mesma é mais estável em temperaturas inferiores a 45 °C. Portanto, o uso em reações de longa duração deve ser realizado a 40 °C, pois nessa temperatura a atividade é 2,35 U/mg de proteína, aproximadamente 12 % menor que a 45 °C.
- ✓ A concentração máxima de GOS foi de 71,45 g/L e seu rendimento máximo de 23,82 %, foi obtido em 6 horas de reação a 40 °C, 40 % de lactose e 10 U/mL de enzima, o grau de conversão de lactose foi de 48,24 % e o produto gerado composto de 27,14 g/L de galactose, 46,13 g/L de glicose e 155,28 g/L de lactose, além de GOS.
- ✓ Portanto, foi possível concluir que a enzima β -galactosidase é capaz de hidrolisar a lactose presente no soro de queijo em glicose e galactose, em baixas concentrações de lactose (10 %), e produzir galacto-oligossacarídeos pela da reação de transgalactosilação que é favorecida em altas concentrações de lactose.
- ✓ Logo, a utilização dessa enzima torna-se uma alternativa para o reaproveitamento do soro de queijo, servindo de matéria-prima para a fabricação de produtos com baixo teor de lactose.

CAPITULO VI

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Nesse trabalho não foram englobadas todas as possibilidades de pesquisa, sugerindo-se para a continuidade do trabalho:

- Estudar a reação de transgalactosilação e a hidrólise da lactose em sistemas contínuos.
- Estudar a reação de transgalactosilação e a hidrólise da lactose com enzima imobilizada.
- Estudar a reação de transgalactosilação e a hidrólise da lactose em diferentes valores de pH, temperatura, concentração de enzima e concentração de lactose.

CAPITULO VII

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALENCAR, A. de A. *Produção de bacitracina por Bacillus licheniformis (UCP1010) utilizando meio alternativo à base de soro de leite*. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais) – curso de Pós-graduação em Desenvolvimento de Processos Ambientais, Universidade Católica de Pernambuco, Recife, 2011.

ALMEIDA, M. M. *Síntese de Galacto-oligossacarídeos por b-galactosidase de Scopulariopsis sp a partir da lactose*. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos), Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

ALMEIDA, M. M.; PASTORE, G. M. *Produção de galactooligossacarídeos por β -galactosidase utilizando metodologia de superfície de resposta*. Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento, v. 32, p. 10-14, 2004.

AOAC. Association of Official Analytical Chemistry. *Official Methods of Analysis*. 18 th edition. Washington, USA, 2005.

BOBBIO, P. A.; BOBBIO, F. O. *Introdução à Química de Alimentos*. São Paulo, SP. Livraria Varela, 1992.

BOON, M. A.; JANSSEN, A. E. M.; RIET, K. V. *Effect of temperature and enzyme origin on enzymatic synthesis of oligosaccharides*. Enzyme and Microbial Technology, v. 26, p. 271-281, 2000.

BRADFORD, M. M. *A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding*. Analytical Biochemistry, New York, v. 72, n. 1/2, p. 248-254, 1976.

CAMPELLO, G. da S. *Imobilização de β -galactosidase (Lactozym[®]) em Eupergit[®] C e sua caracterização*. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Alimentos), Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2010.

CAMPOS, T. C. A. S.; ALMEIDA, W. K.; ALEGRO, L. C. A.; ROIG, S. M.; SUGUIMOTO, H. H. *Utilização da β -galactosidase na hidrólise da lactose do leite em baixa temperatura*. Unopar Científica. Ciências Biológicas e da Saúde, v. 11, n. 4, p. 51-54, 2009.

CARMINATTI, C. A. *Ensaio de hidrólise enzimática da lactose em reator a membrana utilizando beta-galactosidase Kluyveromyces lactis*. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Curso de Pós-graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2001.

CASTRO, F. P.; CUNHA, T. M.; OGLIARI, P. J.; TEÓFILO, R. F.; FERREIRA, M. M. C.; PRUDÊNCIO, E. S. *Influence of different content of cheese whey and oligofructose on the properties of fermented lactic beverages: Study using response surface methodology*. Food Science and Technology, v. 42, p. 993-997, 2009.

CHEN, S. X.; WEI, D. Z.; HU, Z. H. *Synthesis of galacto-oligosaccharides in AOT/isooctane reverse micelles by β -galactosidase*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v. 16, n. 2, p. 109-114, 2001.

CHOCKCHASAWASDEE, S.; AYHANASOPOULOS, V. I.; NIRANJAN, K.; RASTALL, R. A. *Synthesis of galacto-oligosaccharide from lactose using β -galactosidase from Kluyveromyces lactis: Studies on batch and continuous UF membrane-fitted bioreactors*. Biotechnology and Bioengineering, v. 89, n. 4, p. 434-443, 2005.

CODEX ALIMENTARIUS. *Standard for whey powder*. Codex Stan A - 15 - 1995, (2005).

COLINAS, B. R.; ARROJO, L. F.; BALLESTEROS, A. O.; PLOU, F. J. *Galacto-oligosaccharides formation during enzymatic hydrolysis of lactose: Towards a prebiotic-enriched milk*. Food Chemistry, v. 145, p. 388-394, 2013.

FODA, M. I.; LÓPEZ-LEIVA, M. *Continuous production of oligosaccharides from whey using a membrane reactor*. Process Biochemistry, v. 35, p. 581-587, 2000.

GABARDO, S. *Otimização da bioconversão de lactose do soro de queijo em etanol em sistemas de biorreatores imobilizados*. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

GEKAS, V.; LÓPEZ-LEIVA, M. *Hydrolysis of lactose: a literature review*. Process Biochemistry, p.2-12, 1985.

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

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.

HÚNGARO, H. M.; CALIL, N. O.; FERREIRA, A. S.; CHANDEL, A. K.; SILVA, S. S. *Fermentative production of ribonucleotides from whey by *Kluyveromyces marxianus*: effect of temperature and pH*. Journal of Food Science e Tecnologia, v. 50, p. 958-964, 2013.

JURADO, E.; CAMACHO, F.; LUZON, G.; VICARIA, J.M. *Kinetic model for lactose hydrolysis in a recirculation hollow-fiber bioreactor*. Chemical Engineering Science, v. 59, p. 397- 405, 2004.

KLEIN, M. P. *Imobilização de β -galactosidase para obtenção de produtos lácteos com baixo teor de lactose*. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

LISBOA, C. R. *Síntese enzimática de galactooligosacarídeos a partir de lactose e soro de leite*. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciências de Alimentos), Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2008.

LISBOA, C. R.; COSTA, F. A. A.; BURKERT, J. F. M.; BURKERT, C. A. V. *Síntese de galacto-oligosacarídeos a partir de lactose usando β -galactosidase comercial de *Kluyveromyces lactis**. Brazilian Journal of Food Technology, v. 15, n. 1, p. 30-40, 2012.

MANERA, A. P. *Síntese de Galacto-oligosacarídeos a partir de células permeabilizadas de *Kluyveromyces marxianus**. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos), Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.

MARTINEZ-VILLALUENGA, C.; CARDELLE-COBAS, A.; OLANO, A.; CORZO, N.; VILLAMIEL, M.; JIMENO, M.L. *Enzymatic synthesis and identification of two trisaccharides produced from lactulose by transgalactosylation*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 56, p. 557-563, 2008.

MARTINS, A. R. *Conversão da lactose e síntese de galactooligosacarídeos por ação de β -galactosidase e de microrganismos probióticos em bioprocessos simultâneos com catálise e fermentação láctica*. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) –

Curso em Pós-graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2009.

MARTINS, A. R.; BURKERT, C. A. V. *Revisão: Galacto-oligossacarídeos (GOS) e seus efeitos prebióticos e bifidogênicos*. Brazilian Journal of Food Technology, v. 12, n. 3, p. 230-240, 2009.

MATIOLI, G. *Hidrólise da lactose com a enzima beta-galactosidase – Modelagem cinética*. Dissertação (Mestrado em Ciências de Alimentos) – Curso de Pós-Graduação em Ciências de Alimentos. Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 1991.

MATIOLI, G., MORAES, F. F.; ZANIN, G. M. *Hydrolysis of lactose by betagalactosidase from Kluyveromyces fragilis: characterization of the enzyme*. Acta Scientiarum, Maringá, v. 23, p. 655-659, 2001.

MATIOLI, G.; MORAES, F. F.; ZANIN, G. M. *Operational stability and kinetics of lactose hydrolysis by β -galactosidase from Kluyveromyces fragilis*. Acta Scientiarum, Maringá, v. 25, n. 1, p. 7-12, 2003.

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

MORITA, T.; ASSUMPCÃO, R. M. V. *Manual de soluções, reagentes e solventes: padronização, preparação, purificação com indicadores de segurança e de descarte de produtos químicos*, 2ª. edição. São Paulo: Editora Blucher, 2007.

NOVO. *Application of yeast lactase: a review*. Bagsvaerd: Novo Nordisk. 1979, p.28. Novo's file number A 5489.

OTIENO, D. O. *Synthesis of β -Galactooligosaccharides from lactose using microbial β -Galactosidases*. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. v.9, p. 474, 2010.

OVSEJEVI, K.; GRAZÚ, V.; VIEIRA, F. B. *β -Galactosidase from Kluyveromyces lactis immobilized on to thiol-sulfinate/thiol-sulfonate supports for lactose hydrolysis in milk and dairy by-products*. Biotechnology Techniques, v. 12, n. 2, p. 143-148, 1998.

PAULA, J. C. J.; ALMEIDA, F. A.; PINTO, M. S.; TEODORO, V. A. M.; COSTA, R. G. *Elaboração de soro de queijo de coalho na elaboração de bebida láctea pasteurizada*. Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes, v. 67, n. 387, p. 13-20, 2012.

RUSTOM, I. Y. S.; FODA, M. I.; LOPEZ-LEIVA, M. H. *Formation of oligosaccharides from whey UF-permeate by enzymatic hydrolysis – analysis of factors*. Food Chemistry, v. 62, p. 141- 147, 1998.

SANTOS, R. *Produção de galactooligosacarídeos por lactase fúngica*. Dissertação (Mestrado em Ciências de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, 2006.

SANTOS, R.; SIMIQUELI, A. P. R.; PASTORE, G. M. *Produção de galactooligosacarídeo por Scopulariopsis sp*. Ciência e Tecnologia de Alimentos. v. 29, n. 3, p. 682-689, 2009.

TEIXEIRA, L. V.; FONSECA, L. M. *Perfil físico-químico do soro de queijos mozzarella e minas-padrão produzidos em várias regiões do estado de Minas Gerais*. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v.60, n.1, p. 243-250, 2008.

TOMAL, A. A. B.; CUNHA, M. E. T.; BOSSO, A.; YOUSSEF, E. Y.; SUGUIMOTO, H. H. *Avanços tecnológicos na obtenção, purificação e identificação de galactooligosacarídeos e estudo de suas propriedades prebióticas*. Científica, Ciências Biológicas e da Saúde, v. 12, n. 4, p. 41-49, 2010.

TREMARIN, A. *Condições operacionais na hidrólise enzimática da lactose em reator a membrana*. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.

TRINDER, P. *Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor*. Annals of Clinical Biochemistry, v. 6, p. 24-27, 1969.

VALERO, J. I. S. *Production of galacto-oligosacarídeos from lactose by immobilized β -galactosidase and posterior chromatographic separation*. Dissertation (Doctor of Philosophy), The Ohio State University, 2009.

ZANIN, G. M.; MORAES, F. F. *Tecnologia de Imobilização de Células e Enzimas Aplicada à Produção de Álcool de Biomassas*. Relatório nº 2, junho, p. 315-321, 1987.

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

CAPITULO VIII

ANEXO

Neste capítulo mostram-se os resultados dos ensaios da atividade enzimática em função do pH e da temperatura, e da estabilidade térmica da enzima. Estão representadas aqui as curvas de concentração de glicose em função do tempo de reação, junto com as equações ajustadas para os diferentes valores de pH e temperatura.

8.1. Gráficos e equações da influência do pH e da temperatura na atividade enzimática.

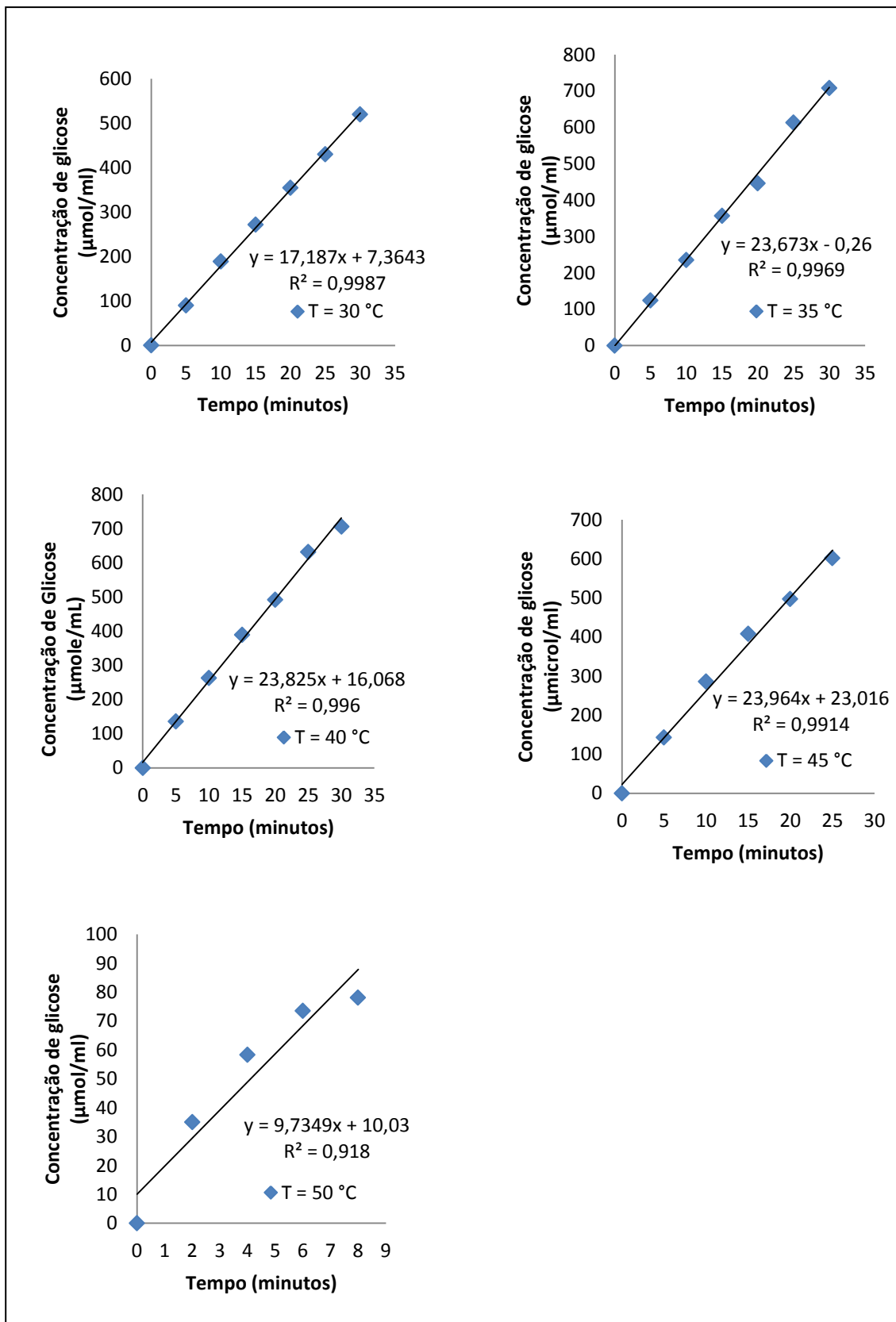


Figura 8. 1: Concentração da glicose em função do tempo de reação em solução de lactose 5 % e pH 6,0, em diferentes temperaturas.

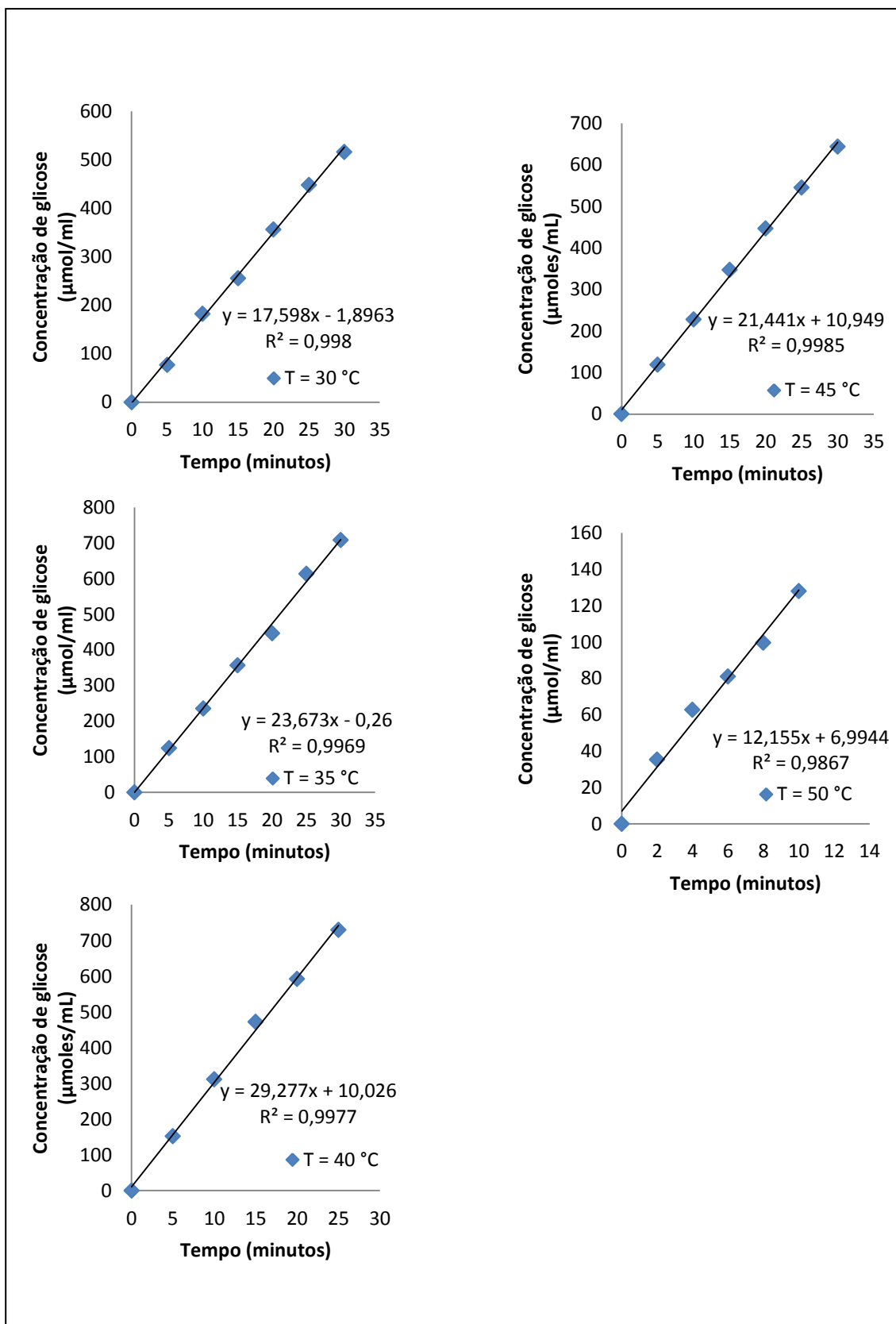


Figura 8. 2: Concentração da glicose em função do tempo de reação em solução de lactose 5 % e pH 6,5, em diferentes temperaturas.

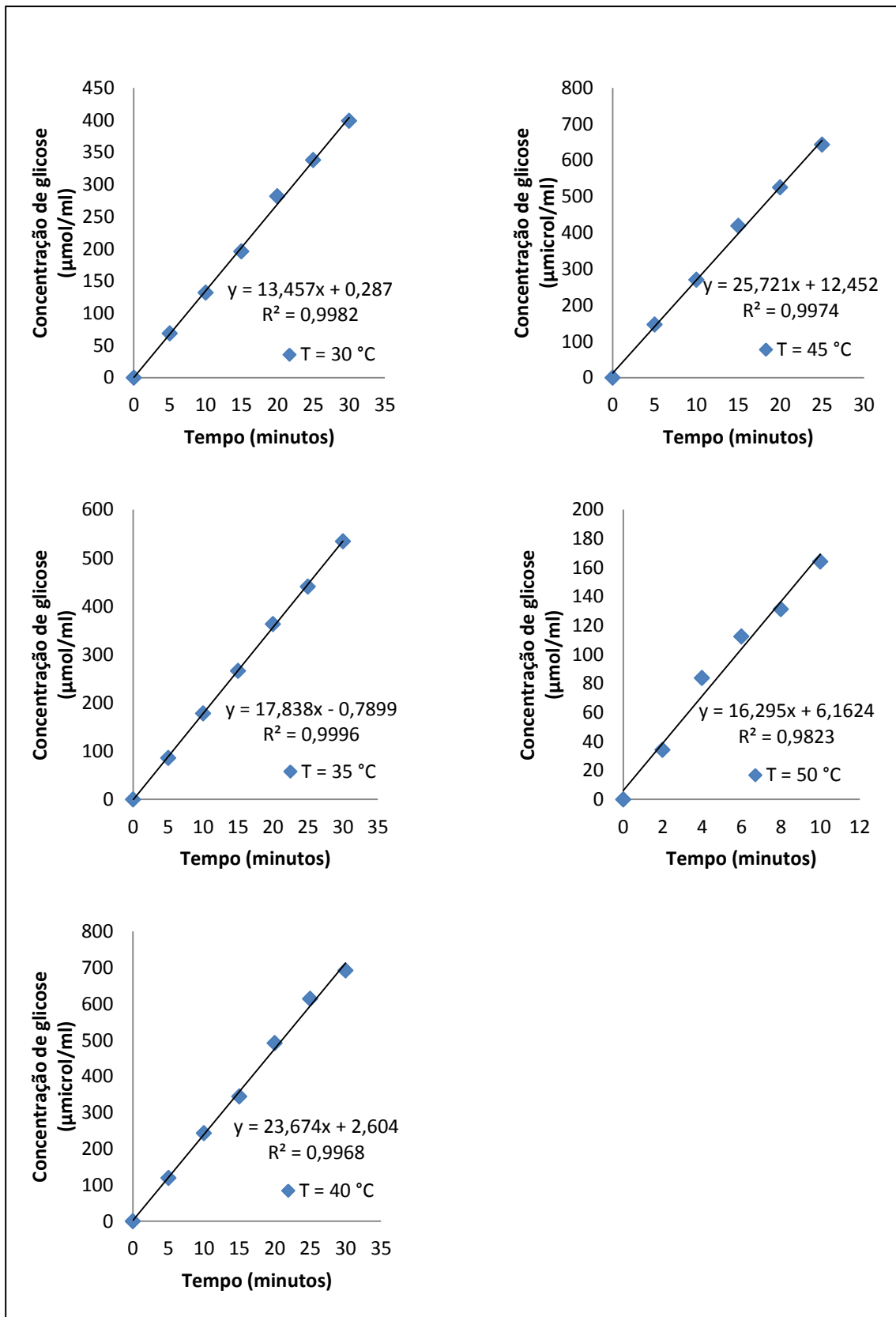


Figura 8. 3: Concentração da glicose em função do tempo de reação em solução de lactose 5 % e pH 7,0, em diferentes temperaturas.

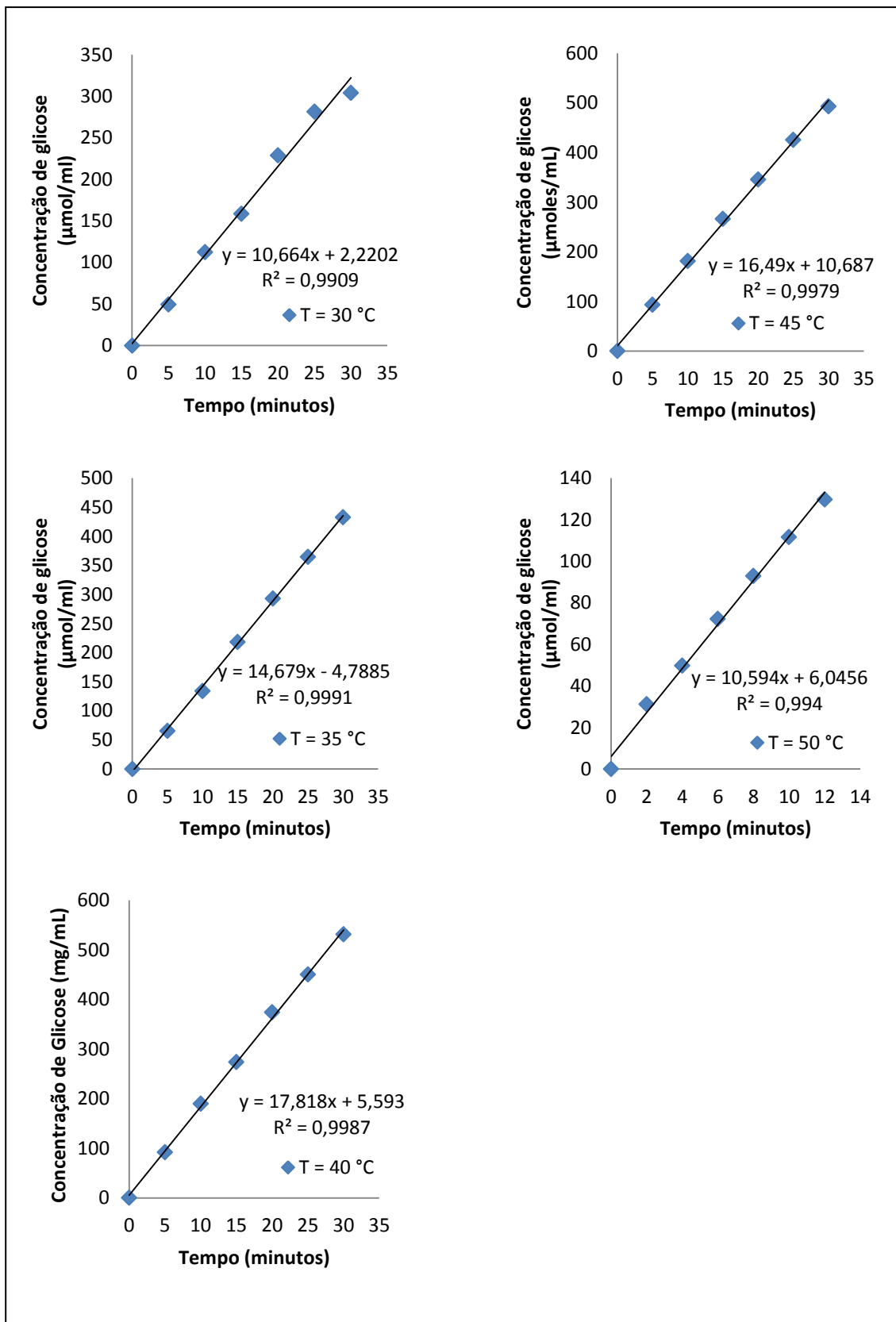


Figura 8. 4: Concentração da glicose em função do tempo de reação em solução de lactose 5 % e pH 7,5, em diferentes temperaturas.

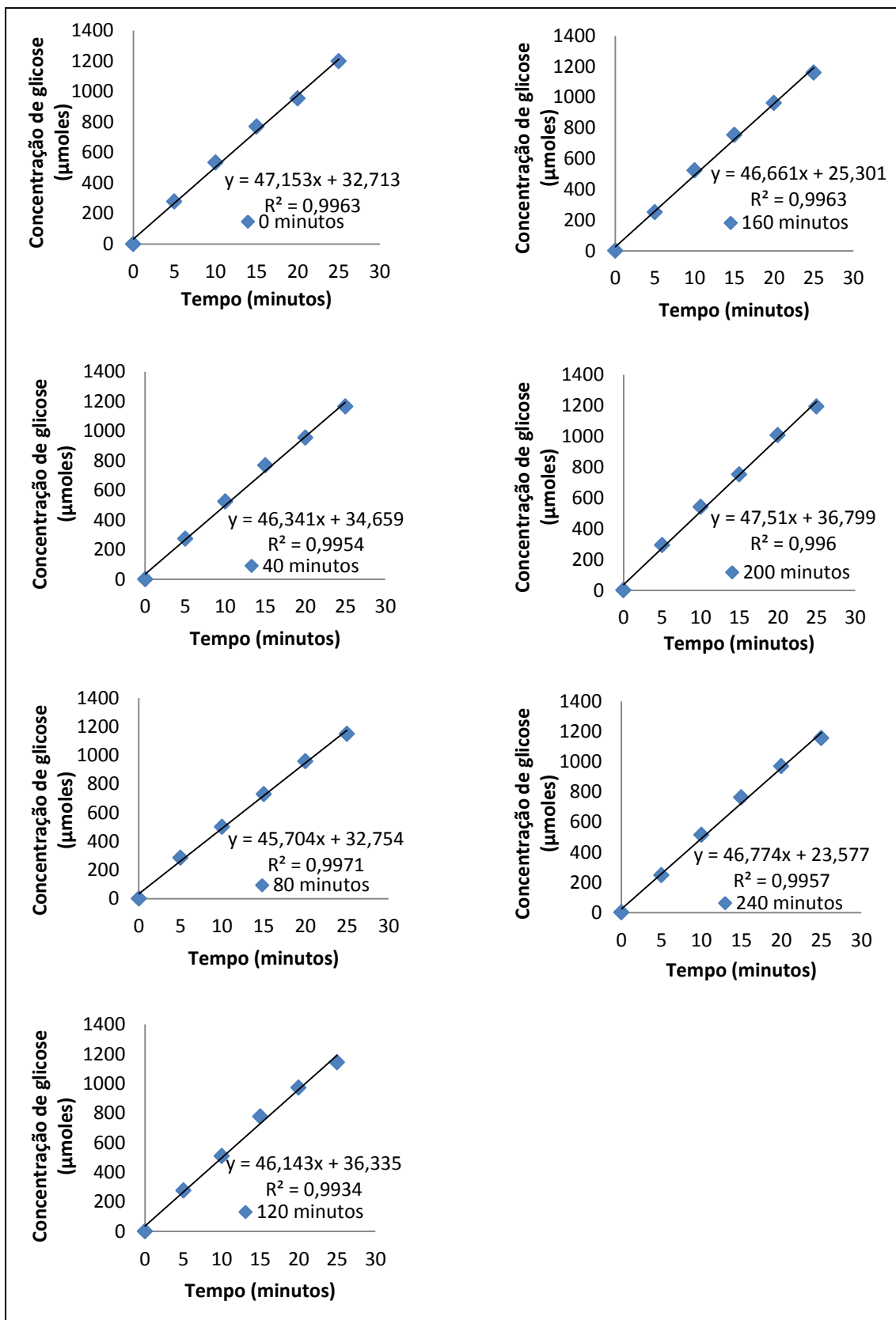
8.2. Gráficos do ensaio de estabilidade térmica (lactose 5 % e pH 6,5).

Figura 8. 5: Concentração da glicose em função do tempo de reação em solução de lactose 5 % na temperatura de 30 °C.

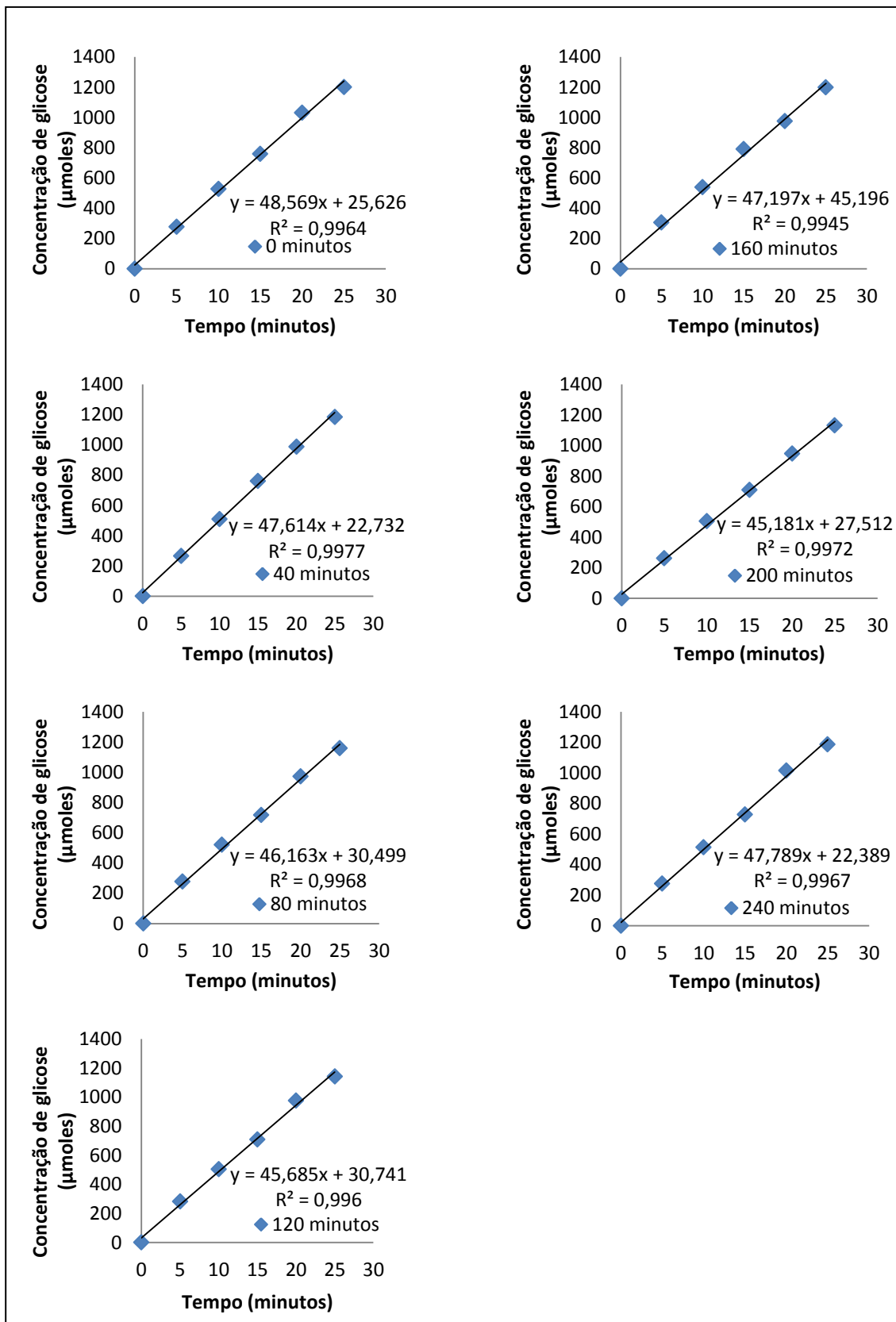


Figura 8. 6: Concentração da glicose em função do tempo de reação em solução de lactose 5 % na temperatura de 35 °C.

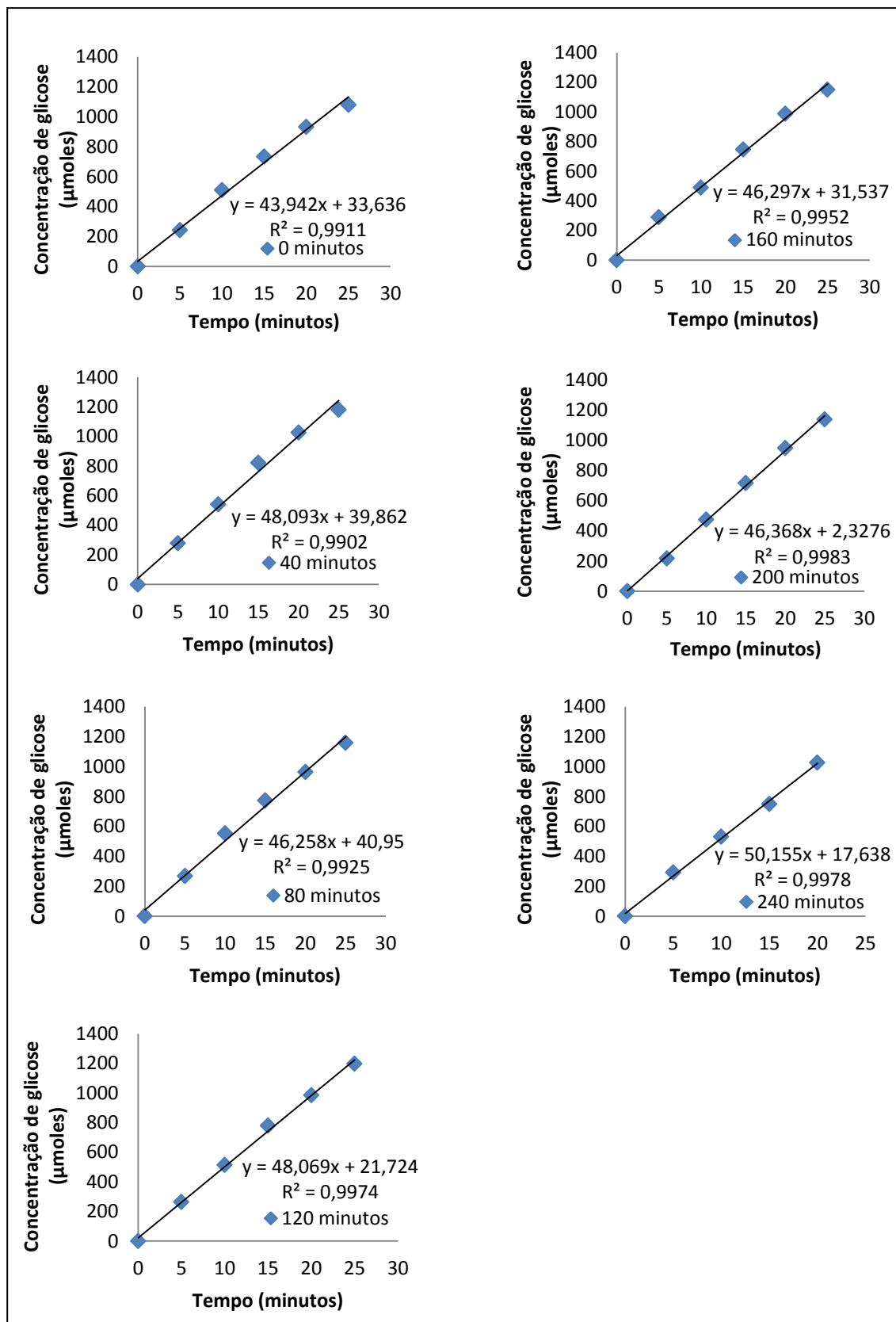


Figura 8. 7: Concentração da glicose em função do tempo de reação em solução de lactose 5 % na temperatura de 40 °C.

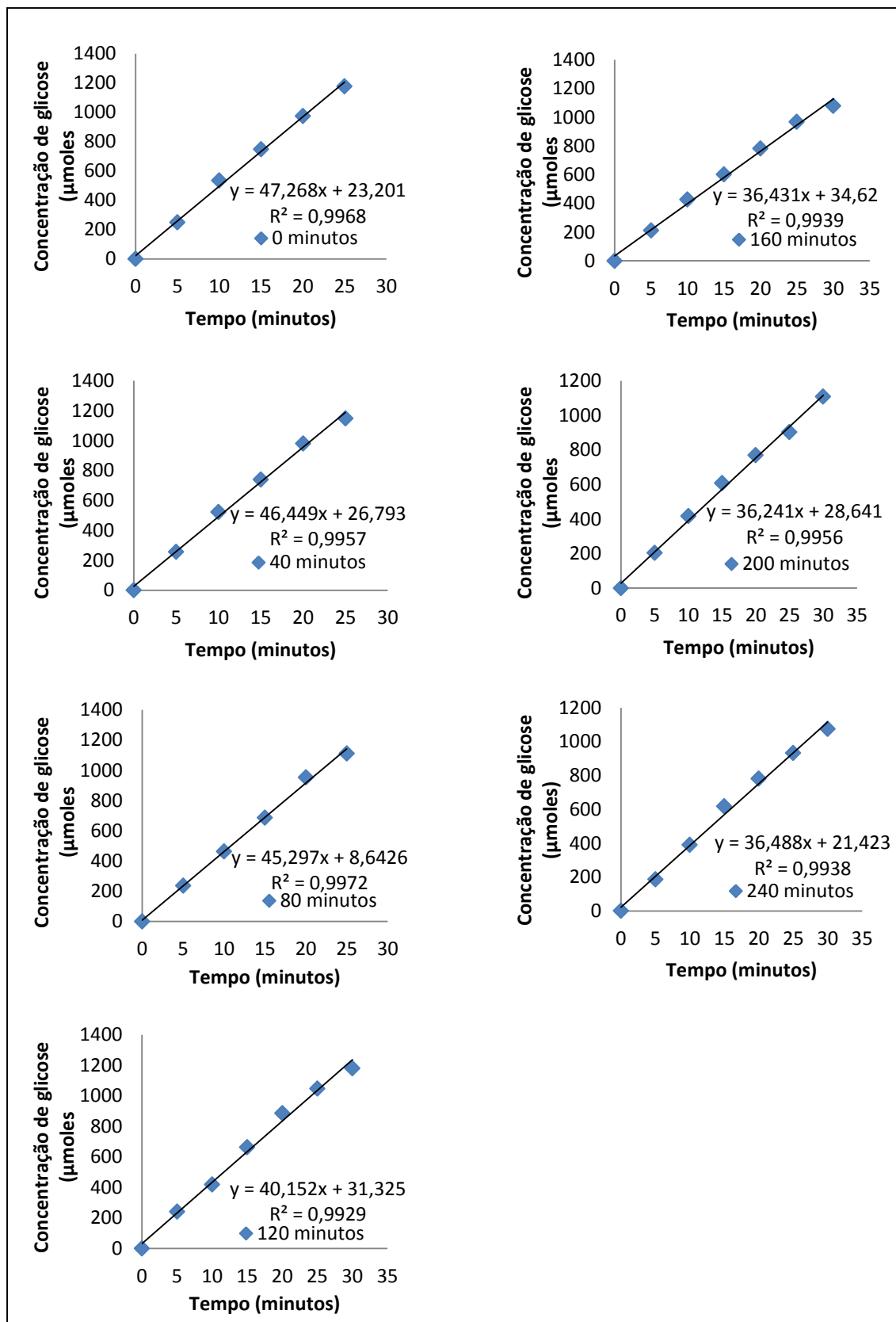


Figura 8. 8: Concentração da glicose em função do tempo de reação em solução de lactose 5 % na temperatura de 45 °C.

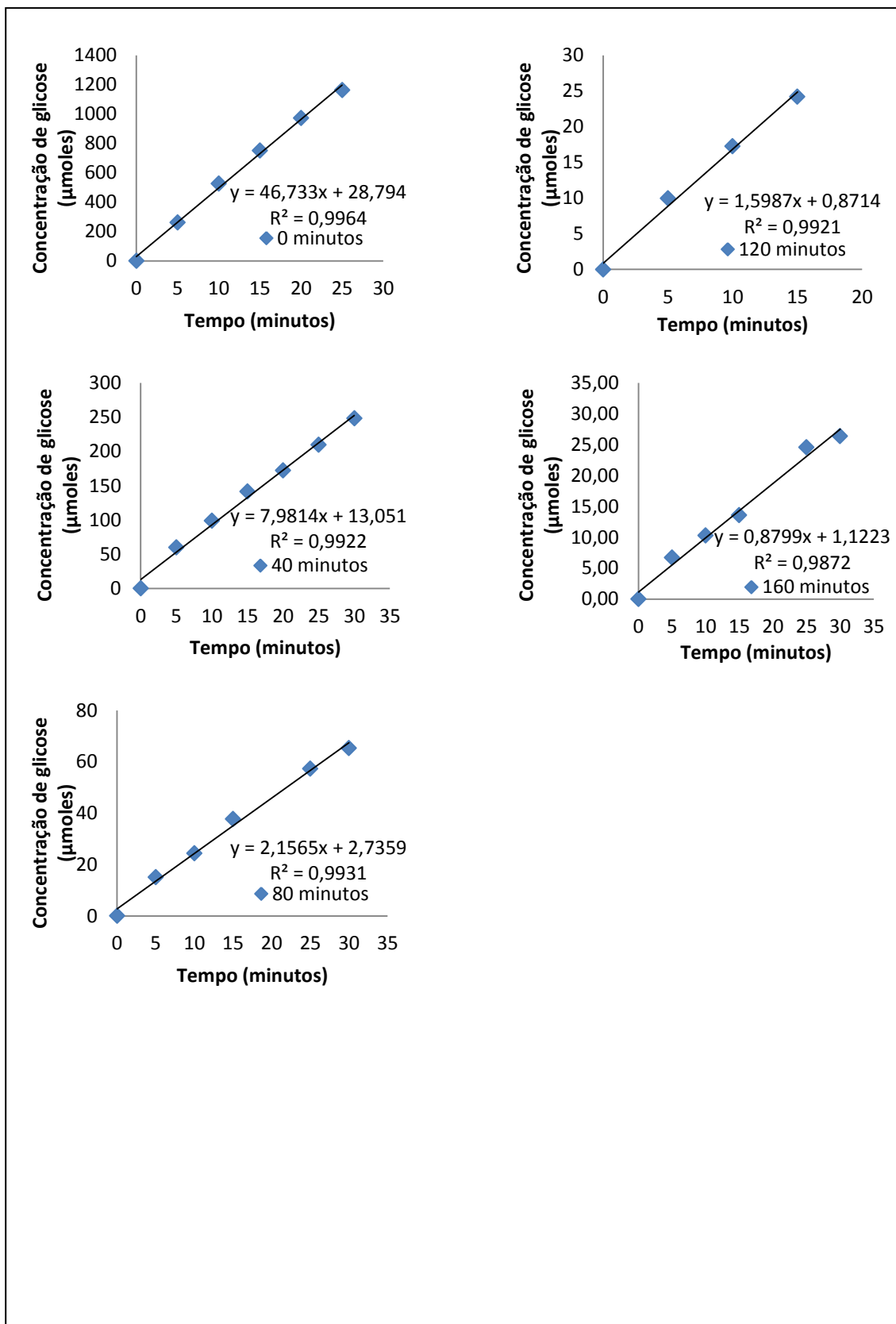


Figura 8. 9: Concentração da glicose em função do tempo de reação em solução de lactose 5 % na temperatura de 50 °C.