

# Açúcares funcionais Galactooligosacarídeos

Produção de galactooligosacarídeos por  $\beta$ -galactosidase utilizando metodologia de superfície de resposta

## **Mareci Mendes de Almeida**

Prof. Dr. Depto de Engenharia de Alimentos,  
Universidade Estadual de Ponta Grossa, UEPG  
mareci@uepg.br

## **Gláucia Maria Pastore**

Prof. Titular, Depto de Ciência de Alimentos  
Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP  
glaupast@fea.unicamp.br

Fotos cedidas pelas autoras

## 1. Introdução



Os oligossacarídeos são açúcares encontrados naturalmente em muitos alimentos como frutas, vegetais, leite e mel. Alguns destes não apresentam só a função nutricional ou de adoçante, mas também exibem atividade fisiológica, sendo assim denominados de alimentos funcionais (Nakano, 1998). Eles melhoram a qualidade dos alimentos, promovendo uma modificação no “flavor”, nas características físico-químicas apresentam propriedades benéficas para a saúde do consumidor (Crittenden e Playne, 1996).

Nos últimos anos o interesse e consumo de oligossacarídeos têm crescido muito, particularmente no Japão e Europa. Em 1991 o governo japonês criou o termo FOSHU (food for specified health use) para os alimentos funcionais. Em 1996 havia 58 alimentos listados, e entre estes 34 incorporavam oligossacarídeos (Crittenden e Playne, 1996), em 2003 foram mais de 300 alimentos relacionados como FOSHU, sendo que 30% destes apresentavam oligossacarídeos em sua formulação (Taniguchi, 2004).

Os açúcares dos alimentos são determinantes para a composição da microflora intestinal (Sako et al., 1999). Os carboidratos que participam da dieta podem ser classificados com base nas propriedades fisiológicas de digeríveis ou não-digeríveis, havendo três principais tipos de carboidratos não-digeríveis: os polissacarídeos não-amídicos, os amidos resistentes e os oligossacarídeos não-digeríveis

(Voragen, 1998), estando neste grupo incluídos os galactooligosacarídeos (GOS).

Os GOS apresentam configuração  $\beta$  e as enzimas digestivas gastrointestinais humanas são principalmente específicas para ligações  $\alpha$ , sendo então resistentes à digestão e absorção no intestino atingindo o cólon, onde são fermentados, promovendo um aumento das bifidobactérias (Sako, 1999) e redução das bactérias deterioradoras, consequentemente ocasionando efeitos benéficos para a saúde humana com a redução de metabólitos tóxicos (Modler, 1994; Tomomatsu, 1994). A ingestão de GOS aumenta a mineralização óssea e a resistência contra fraturas, devido à estimulação da absorção de cálcio (Brouns e Vermeer, 2000). Ainda são usados em confeitos, gomas de mascar, iogurtes e bebidas como açúcares de baixa cariogenicidade, pois não são metabolizados pela microflora bucal para formar ácidos e poliglucanas.

A formação de GOS a partir da lactose é influenciada por diversos fatores como a fonte e concentração da enzima, pH, temperatura e concentração do substrato (Mahoney, 1998; Rustom et al., 1998). Quanto mais lactose houver no sistema maior será a produção de GOS (López-Leiva e Gusman, 1995; Albayrak e Yang, 2002; Roy et al., 2002). Os GOS são compostos de lactose e unidades de galactose, produzidos comercialmente por reação enzimática onde resíduos de galactose são ligados na lactose (Zarató e López-Leiva, 1990).

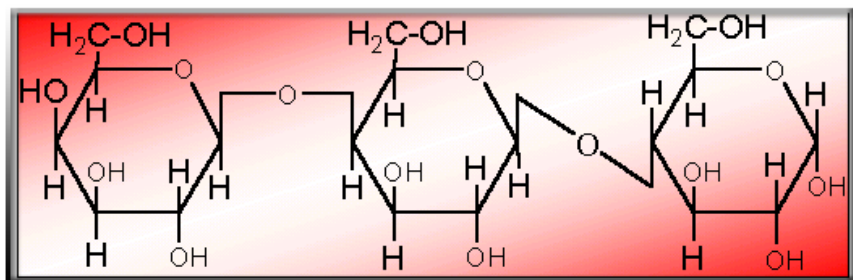
Para se estudar os efeitos dos fatores por análise univariável, além de necessitar de um grande número

**Tabela 1** – Fatores e níveis estudados no planejamento experimental fatorial de 2 níveis

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

**Tabela 2** – Matriz dos experimentos para planejamento experimental fatorial de dois níveis e a porcentagem de área de 4'gal-lactose formados

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



**Figura 1** – Estrutura do galactooligossacarídeo 4'galactosil lactose

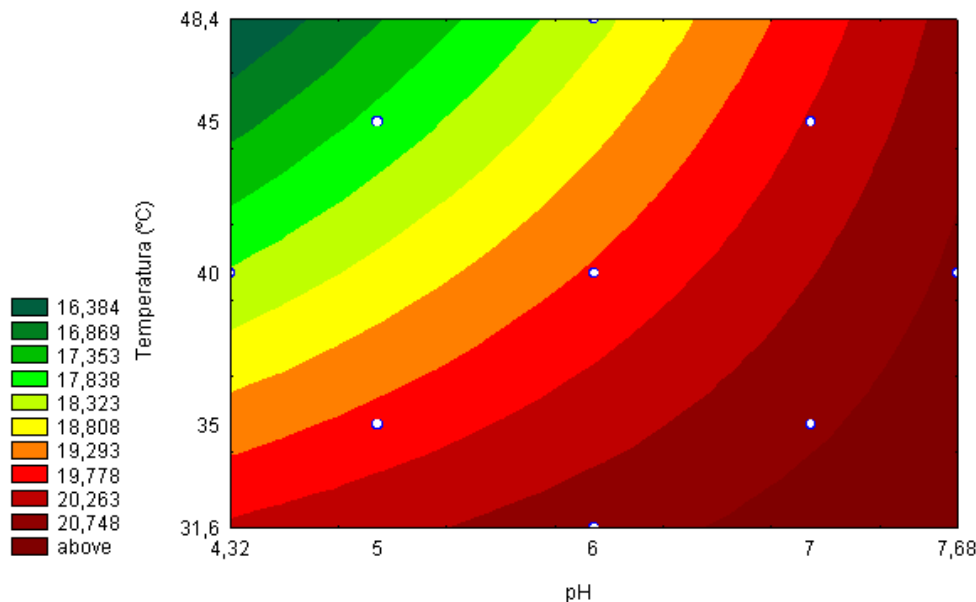
de experimentos a avaliação só pode ser feita individualmente, onde um fator é fixado num valor e varia-se o outro até descobrir o valor que produz o maior rendimento, sem se levar em conta que ocorre interação entre as variáveis (Barros Neto et al., 1995). Utilizando-se da metodologia de superfície de resposta pode-se obter como resultado a interação dos fatores e uma faixa de melhor atuação.

## 2. Materiais e métodos

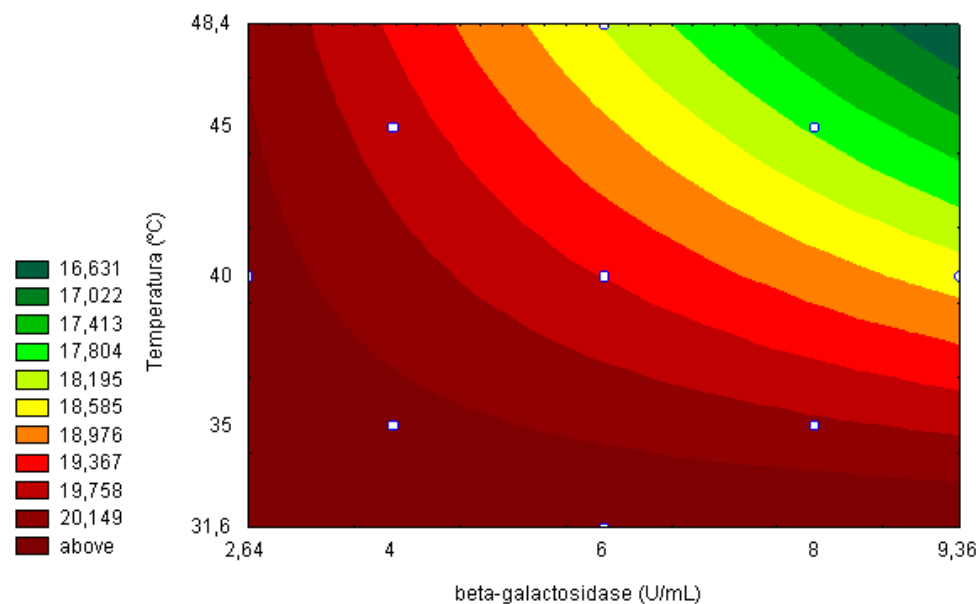
A enzima  $\beta$ -galactosidase foi sintetizada pelo fungo *Scopulariopsis* isolado por Pastore e Park (1979). O microrganismo foi produzido por fermentação semi-sólida, cultivado em farelo de trigo e água na proporção de 1:1 (p/v). Em frasco erlenmeyer de 500 mL contendo 20g de substrato, foi adicionada uma suspensão de esporos ( $10^8$  esporos/mL) e incubado a 30°C por 7 dias. Após o crescimento foi adicionada água destilada e o meio triturado com bastão de vidro para liberação da enzima, obtendo-se após filtração o extrato enzimático, que foi tratado com sulfato de amônio a 80%. O precipitado obtido (enzima bruta) foi dialisado contra água, centrifugado e liofilizado.

A atividade da  $\beta$ -galactosidase (EC 3.2.1.23  $\beta$ -galactosídeo galactohidrolase) foi determinada usando *o*-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo (ONPG) como substrato. O meio de reação constou de 1,55 mL de ONPG 0,25% em tampão acetato de sódio 0,1M a pH 5,0; 0,15 mL de solução enzimática, sendo a mistura incubada a 60°C por 15 minutos, a reação foi paralisada com 0,15 mL de carbonato de sódio a 10%. Para analisar o produto da reação foi utilizado espectrofotômetro e a absorbância medida a 420 nm, contra branco. Uma unidade de atividade de  $\beta$ -galactosidase foi definida como a quantidade de enzima que libera 1  $\mu$ mol de *o*-nitrofenol por minuto em 1 mL, nas condições de ensaio.

O sistema de reação para a produção de galactooligossacarídeos consistiu na mistura da enzima  $\beta$ -galactosidase com solução de lactose a 40% (p/v), preparada em tampões com valores de pH preestabelecidos. Foi utilizado um planejamento fatorial



**Figura 2** – Efeito do pH e da temperatura na produção de 4'gal-lactose, utilizando 6U/mL de  $\beta$ -galactosidase



**Figura 3** – Efeito da temperatura e da concentração de  $\beta$ -galactosidase na produção de 4'gal-lactose em pH 6,0

**Tabela 3** – Efeito da concentração da enzima, pH e temperatura na síntese de galactooligosacarídeos

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

completo  $2^3$ , os níveis de estudo estão apresentados na tabela 1. Foram analisadas as variáveis independentes: pH, temperatura e concentração de enzima, e a variável dependente: síntese do galactooligosacarídeo 4'galactosil-lactose (Figura 1). Após 24 horas o experimento foi interrompido pela inativação da enzima em banho fervente por 10 minutos e os produtos foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (cromatógrafo Waters) com coluna Supelcogel™ Ca (300x7,8mm), tendo como fase móvel a água com fluxo de 0,5 mL/min a 80°C e detectados por índice de refração. A análise estatística dos resultados foi realizada através do software STATISTICA utilizando Experimental design.

### 3. Resultados e discussão

Os resultados da análise correspondentes ao planejamento fatorial de dois níveis são apresentados na tabela 2, toda a análise foi realizada com os valores das variáveis dependentes codificados. A resposta considerada foi a porcentagem de área do galactooligosacarídeo 4'galactosil-lactose (4'gal-lactose). As variáveis pH, temperatura e concentração de enzima e suas interações foram significativas a nível de 10%.

Conforme demonstrado na tabela 3, o efeito da concentração de enzima, do nível -1 para +1, foi negativo, indicando que 4U/mL (-1) de enzima apresentou melhor produção de 4'gal-lactose do que 8U/mL (+1), o que pode ser comprovado analisando as figuras 3 e 4, onde se observa a tendência de aumentar a síntese de galactooligosacarídeos com a diminuição da concentração de enzima.

O efeito do pH, quando houve aumento do nível -1 para +1, foi positivo, assim na faixa estudada o valor de pH 7,0 foi melhor, para a síntese do galactooligosacarídeo, que o valor de pH 5,0, havendo uma tendência de se trabalhar com valores de pH menos ácidos (figuras 2 e 4).

Quando analisada a variação da temperatura o efeito foi negativo indicando que a temperatura no nível

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

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

mais baixo (35°C) foi mais adequada para o sistema, e em temperaturas mais altas a tendência é diminuir a produção de 4'gal-lactose (figuras 2 e 3). O modelo matemático obtido através da análise estatística é apresentado na equação abaixo com  $R^2 = 0,9838$ , onde  $x_1 =$  enzima,  $x_2 =$  pH e  $x_3 =$  temperatura:

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

Conforme a tabela 4, a análise de variância demonstra que o modelo é preditivo e estatisticamente significativo com a relação Fcal/Ftab de 41,19;  $p < 0,1$ .

As condições estudadas para produção de GOS se mostram bastante promissoras, pelo perfil cromatográfico das amostras obtidas do planejamento experimental (não mostrado) pode-se observar que vários galactooligossacarídeos são sintetizados, provavelmente tetrassacarídeos e açúcares maiores, porém só foi identificado o trissacarídeo 4'gal-lactose. Apesar de não haver grandes variações nas respostas do planejamento em relação à síntese de 4'gal-lactose, o ensaio 12 da tabela 5.2 apresentou maior produção de GOS, sendo obtido 21% de 4'gal-lactose que equivale a 84 mg/mL.

Onishi e Tanaka (1995) obtiveram 78mg/mL de GOS a partir de 25% de lactose e após 24 horas de reação utilizando  $\beta$ -galactosidase de *Sterigmatomyces elviae*. Em 1997, estes mesmos autores produziram 72mg/mL de GOS após incubação da  $\beta$ -galactosidase de *Sirobasidium mag-*

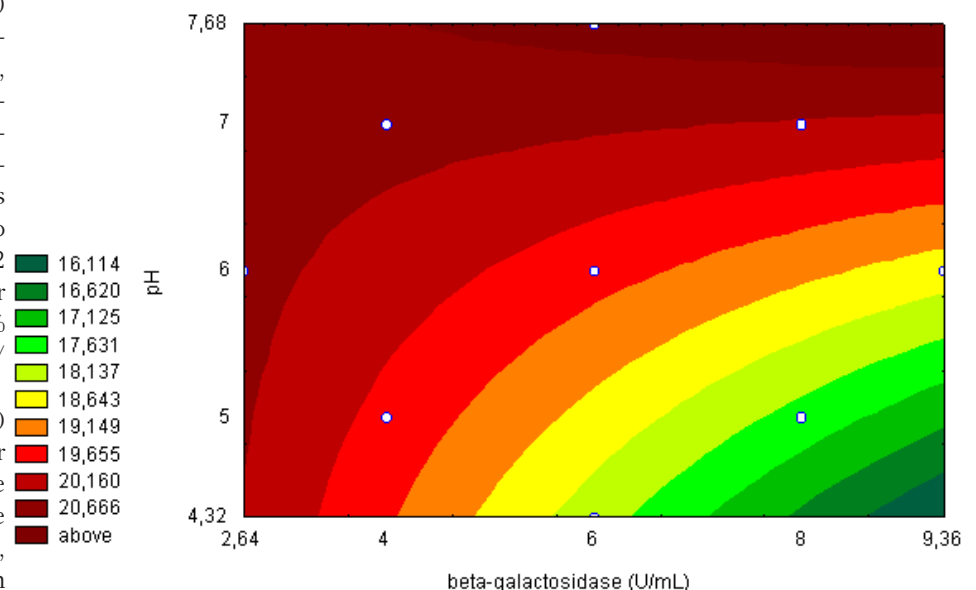
*num* com 20% de lactose por 24 horas. Shin e colaboradores (1998) produziram 160 mg/mL de GOS utilizando  $\beta$ -galactosidase de *Bullera singularis*.

Roy e colaboradores (2002) estudaram a otimização de GOS com  $\beta$ -galactosidase de *Bifidobacterium infantis* utilizando a metodologia de superfície de resposta, as variáveis independentes foram: concentração de células, concentração de lactose, tempo de reação e temperatura; os valores ótimos encontrados estavam próximos à área associada com 40% (p/v) de lactose,  $2,10^9$  ufc/mL, 50°C e 6 horas de reação, obtendo 16% de galactooligossacarídeos. O valor de 40% de lactose foi a maior concentração utilizada pelos autores, confirmando a tendência de que quanto mais lactose houver no meio mais GOS serão sintetizados (Burvall et al., 1979; López-Leiva e Gusman, 1995; Albayrak e Yang, 2002).

O trissacarídeo 4'galactosil-lactose foi preferencialmente formado pela  $\beta$ -galactosidase de *Sporobolomyces singularis* (Gorin et al., 1964) e *Sterigmatomyces elviae* (Onishi et al., 1995). Outros trissacarídeos como 6'gal-lactose foram sintetizados por  $\beta$ -galactosidase de *Aspergillus oryzae* (TOBA et al., 1985) e *Trichoderma barzianum* (PRAKASH et al., 1987), e 3'gal-lactose por *Streptococcus thermophilus* (PERRIN et al., 2000). Em toda a literatura consultada verificou-se que na reação de transgalactosilação catalisada pela  $\beta$ -galactosidase, ocorreu maior formação de trissacarídeos. De acordo com Berger e colaboradores (1995) isto provavelmente ocorre porque os trissacarídeos são os precursores para a síntese dos tetrassacarídeos. A alta produção de 4'gal-lactose [O- $\beta$ -D-Gal-(1-4)- $\beta$ -D-Gal-(1-4)-D-Glc] é de grande interesse porque este tem sido considerado um efetivo promotor de crescimento de bifidobactérias (TANAKA et al., 1983; OHTSUOKA et al., 1989).

#### 4. Referências Bibliográficas

Albayrak, N.; Yang, S.T. Production of galacto-oligosaccharides from lactose by *Aspergillus oryzae* beta-galactosidase immobilized on cotton cloth. **Biotechnology and Bio-engineering**. v. 77, n. 1, p.8-19, 2002.



**Figura 4** – Efeito do pH e da concentração de  $\beta$ -galactosidase na produção de 4'gal-lactose à 40°C

- Barros Neto, B.; Scarminio, I. S.; Bruns R. E. **Planejamento e otimização de experimentos**. 2 ed. Campinas, SP: Editora da Unicamp, 1995, 299p.
- Berger, J.L.; Lee, B.H.; Lacroix, C. Oligosaccharides synthesis by free and immobilized  $\beta$ -galactosidases from *Thermus aquaticus* YT-1. **Biotechnology Letters**. v.17, n. 10, p.1077-1080, 1995.
- Brouns, F.; Vermeer, C. Functional food ingredients for reducing the risks of osteoporosis. **Trends in Food Science & Technology**. v. 11, p. 22-33, 2000.
- Burvall, A.; Asp, N.G.; Dahlqvist, A. Oligosaccharide formation during hydrolysis of lactose with *Saccharomyces lactis* lactase (Maxilat<sup>®</sup>) – Part 1. **Food Chemistry**. v.4, p. 243-250, 1979.
- Crittenden, R.G.; Playne, M.J. Production, properties and applications of food-grade oligosaccharides. **Trends in Food Science & Technology**. v.7, n.11, p.353-361, 1996.
- Gorin, P. A.J.; Spencer, J.F.T.; Phaff, H.J. The structures of galactosyl-lactose and galactobiosyl-lactose produced from lactose by *Sporobolomyces singularis*. **Canadian Journal of Chemistry**. v. 42, 1964.
- López-Leiva, M.; Guzman, M. Formation of oligosaccharides during enzymic hydrolysis of milk whey permeates. **Process Biochemistry**. v. 30, n. 8, p. 757-762, 1995.
- Mahoney, R. R. Galactosyl-oligosaccharide formation during lactose hydrolysis: a review. **Food Chemistry**. v. 63, n. 2 p. 147-154, 1998.
- Modler, H.W. Bifidogenic factors – Sources, metabolism and applications. **International Dairy Journal**. v. 4, p. 383-407, 1994.
- Nakano, H. **Recente Japanese development in the enzymatic production and application of oligosaccharides**; apresentado no Seminar on enzyme and bacterial technology, 1998, Campinas. Japan International Cooperation Agency, [s.d.].
- Ohtsuoka, K.; Benno, Y.; Endo, K.; Ueda, H.; Ozawa, O.; Uchida, T.; Mitsuoka, T. Effects of 4'galactosyl-lactose intake on human fecal flora. **Bifidus**. v. 2, p. 143-149, 1989.
- Onishi, N.; Tanaka, T. Purification and properties of a novel thermostable galacto-oligosaccharide producing  $\beta$ -galactosidases from *Sterigmatomyces elviae* CBS8119. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 61, n.11, p.4026-4030, 1995.
- Onishi, N.; Tanaka, T. Purification and characterization of galacto-oligosaccharide-producing  $\beta$ -galactosidase from *Sirobasidium magnum*. **Letters in Applied Microbiology**. v. 24, p. 82-86, 1997.
- Pastore, G.M.; Park, Y.K. Screening of high  $\beta$ -galactosidase-producing fungi and characterizing the hydrolysis properties of a selected strain. **Journal of Food Science**. v. 44, p. 1577-1579, 1979.
- Perrin, V.; Fenet, B.; Praly, J.; Lacroix, F.; Dung Ta, C. Identification and synthesis of trisaccharides produced from lactose by transgalactosylation. **Carbohydrate Research**. v. 325, p. 202-210, 2000.
- Prakash, S.; Suyama, K.; Itoh, T.; Adachi, S. Oligosaccharide formation by *Trichoderma harzianum* in lactose containing medium. **Biotechnology Letters**. v. 9, n.4, p.249-252, 1987.
- Roy, D.; Daoudi, L.; Azaola, A. Optimization of galacto-oligosaccharide production by *Bifidobacterium infantis* RW-8120 using response surface methodology. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**. v. 29, n. 5, p. 281-285, 2002.
- Rustom, I.Y.S.; Foda, M. I.; López-Leiva, M. H. Formation of oligosaccharides from whey UF-permeate by enzymatic hydrolysis – analysis of factors. **Food Chemistry**. v. 62, n. 2. p. 141-147, 1998.
- Sako, T.; Matsumoto, K.; Tanaka, R. Recent progress on research and applications of non-digestible galacto-oligosaccharides. **International Dairy Journal**. v.9, p.69-80, 1999.
- Shin, H.; Park, J.; Yang, J. Continuous production of galacto-oligosaccharides from lactose by *Bullera singularis*  $\beta$ -galactosidase immobilized in chitosan beads. **Process Biochemistry**. v. 33, n.8, p.787-792, 1998.
- Tanaka, R.; Takayama, H.; Morotomi, M.; Kuroshima, T.; Ueyama, S.; Matsumoto, K.; Kuroda, A.; Mutai, M. Effects of administration of TOS and *Bifidobacterium breve* 4006 on the human fecal flora. **Bifidobacteria Microflora**. v. 2, n. 1, p. 17-24, 1983.
- Taniguchi, H. Carbohydrate Research and Industry in Japan and the Japanese Society of Applied Glycoscience. **Starch**. v. 56, p. 1-5, 2004.
- Toba, T.; Yokota, A. E.; Adachi, S. Oligosaccharide structures formed during the hydrolysis of lactose by *Aspergillus oryzae*  $\beta$ -galactosidase. **Food Chemistry**. v. 16, p. 147-162, 1985.
- Tomomatsu, H. Health effects of oligosaccharides. **Food Technology**. v.48, n. 10, p.61-65, 1994.
- Voragen, A.G.J. Technological aspects of functional food-related carbohydrates. **Trends in Food Science & Technology**. v.9, p. 328-335, 1998.
- Zarató S.; López-Leiva, M. H. Oligosaccharide formation during enzymatic lactose hydrolysis: a literature review. **J. Food Prot.** v. 53, p. 262-268, 1990.