

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA NATUREZA (CCN)  
*CAMPUS LAGOA DO SINO*

LAIS SALDANHA BOLOGNESI

**PRODUÇÃO BIOTECNOLÓGICA DE GALACTO-OLIGOSSACARÍDEOS (GOS) A  
PARTIR DO SORO DO QUEIJO PORUNGO**

BURI – SP

2021

LAIS SALDANHA BOLOGNESI

**PRODUÇÃO BIOTECNOLÓGICA DE GALACTO-OLIGOSSACARÍDEOS (GOS) A  
PARTIR DO SORO DO QUEIJO PORUNGO**

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado ao departamento Acadêmico  
Lagoa do Sino da Universidade Federal  
de São Carlos, para obtenção do título de  
bacharel em Engenharia de Alimentos.

Orientadora: Profa. Dra. Sabrina Gabardo

BURI – SP

2021

## FICHA CATALOGRÁFICA

Saldanha Bolognesi, Lais

Produção Biotecnológica de Galacto-oligossacarídeos (GOS) a partir do soro do queijo Porungo / Lais Saldanha Bolognesi -- 2021.  
48f.

TCC (Graduação) - Universidade Federal de São Carlos, campus Lagoa do Sino, Buri

Orientador (a): Sabrina Gabardo

Banca Examinadora: Prof. Dr. Naaman Francisco

Nogueira Silva, Prof. Dr. Natan de Jesus Pimentel Filho

Bibliografia

1. Bioprocessos. 2. Aproveitamento de resíduos agroindustriais . 3. Prebióticos. I. Saldanha Bolognesi, Lais. II. Título.

Ficha catalográfica desenvolvida pela Secretaria Geral de Informática (SIn)

DADOS FORNECIDOS PELO AUTOR

Bibliotecário responsável: Lissandra Pinhatelli de Britto - CRB/8 7539

FOLHA DE APROVAÇÃO

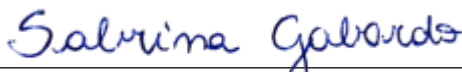
**LAIS SALDANHA BOLOGNESI**

**PRODUÇÃO BIOTECNOLÓGICA DE GALACTO-OLIGOSSACARÍDEOS (GOS) A  
PARTIR DO SORO DO QUEIJO PORUNGO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado  
como requisito parcial à obtenção do título de  
Bacharel em Engenharia de Alimentos pela  
Universidade Federal de São Carlos.

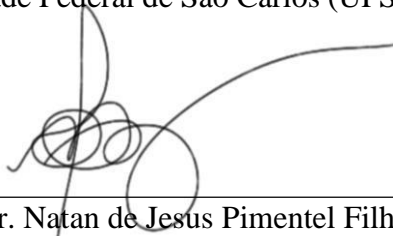
Aprovado em: 22/10/2021.

**BANCA EXAMINADORA**



---

Profa. Dra. Sabrina Gabardo (orientador)  
Universidade Federal de São Carlos (UFSCar)



---

Prof. Dr. Natan de Jesus Pimentel Filho  
Universidade Federal de São Carlos (UFSCar)



---

Prof. Dr. Naaman Francisco Nogueira Silva  
Universidade Federal de São Carlos (UFSCar)

## **AGRADECIMENTOS**

Responsabilidade é uma virtude que deve ser conquistada e, ao longo dos anos, mais e mais vamos agregando um pouco dela em nossas personalidades, seja por experiências que vivemos ou por pessoas que deixamos entrar em nossas vidas. Início esses agradecimentos com essa palavra tão significativa, pois foi com o presente trabalho e orientações de uma pessoa incrível que conquistei uma grande parte do meu senso de responsabilidade. Não poderia deixar de agradecer, primeiramente, a minha orientadora querida, que desde de 2018 pegou nas minhas mãos e me ensinou lições tão importantes. Ela que me ensinou a limpar toda a bagunça depois de um dia cansativo num laboratório e voltar na manhã seguinte pronta para mais alguns experimentos. Foram 4 anos de parceria que me ensinaram muito e para sempre vou levar no meu coração. Obrigada, Sabrina, foi uma honra trabalhar com uma profissional tão sábia quanto você.

Agradeço ainda a minha família que sempre me apoiou e incentivou meus estudos. Dedico todas as minhas conquistas e este trabalho aos meus pais Eglis e Marcelo.

Agradeço a oportunidade de poder estudar numa universidade pública de tamanha qualidade, formada por docentes exímios.

Agradeço a todos aqueles que me auxiliaram durante os meus estudos.

Agradeço aos meus amigos e amigas que me suportaram durante toda a jornada acadêmica.

Agradeço aos meus companheiros de trabalho que sempre se preocuparam com a minha formação acadêmica, especialmente ao meu primeiro e querido gestor Marcio Gallo, pelos ensinamentos durante meu período de estágio.

Agradeço a minha república querida, meu lar, durante os anos da faculdade, e a todas as meninas que dividiram um teto comigo.

“Dream big because big dreams and small ones give us the same work.”

**Jorge Paulo Lemann**

## RESUMO

O aproveitamento de resíduos agroindustriais associado à tecnologia de processos enzimáticos tem incentivado o desenvolvimento de novas estratégias para a obtenção de bioprodutos, tais os galacto-oligossacarídeos (GOS). A enzima  $\beta$ -galactosidase é amplamente utilizada na produção de produtos sem lactose e, recentemente, estudos acerca da produção de GOS tem emergido como forma de aproveitar o principal resíduo das indústrias de laticínios – o soro de queijo. Este se configura como um substrato rico em lactose, contribuindo como fonte alternativa e de baixo custo para a obtenção de GOS, oligossacarídeos que atuam como prebióticos. Uma das formas de obtenção de GOS é através do uso da técnica de imobilização enzimática a qual permite diversas vantagens, entre as quais, a reutilização do biocatalizador, a redução do custo de manutenção e melhora a estabilidade térmica. Neste contexto, o presente projeto visou estudar o aproveitamento do soro do queijo porungo, um produto lácteo característico do sudoeste paulista, para a produção de GOS através da enzima  $\beta$ -galactosidase imobilizada. O trabalho foi dividido em dois momentos, em que no primeiro, duas estratégias de imobilização enzimática foram avaliadas (alginato de cálcio e alginato de cálcio-Concanavalina A) com relação ao pH e temperatura ótimos da enzima. No segundo momento, a obtenção de GOS foi testada utilizando o suporte de imobilização mais promissor em diferentes substratos (solução de lactose e soro de queijo) e em seguida, a partir de diferentes concentrações de lactose ajustadas no soro de queijo ( $200 \text{ g L}^{-1}$  a  $400 \text{ g L}^{-1}$ ) e temperaturas ( $37 \text{ }^\circ\text{C}$  a  $55 \text{ }^\circ\text{C}$ ). A imobilização da enzima permitiu verificar um aumento da faixa de pH ótimo (7,0 a 7,5) para o suporte alginato de cálcio quando comparado a faixa de pH da enzima livre (6,5), enquanto que para o suporte alginato de cálcio-Concanavalina A, uma maior atividade enzimática foi observada para pHs mais baixos (6,0). Com relação a temperatura, a atividade enzimática foi observada maior para a enzima livre em relação aos dois suportes de imobilização testados. Maiores rendimentos de GOS foram observados em soro de queijo de porungo (63,2%) em comparação com a solução de lactose (41,1%), o qual foi empregado na etapa seguinte para avaliar as condições de processo. O rendimento máximo de GOS foi de 17,73%, com conversão de lactose de 61,4%, a  $46 \text{ }^\circ\text{C}$  e  $400 \text{ g L}^{-1}$ . Esses resultados sugerem a possível utilização do soro de queijo porungo como substrato na produção biotecnológica de GOS.

**Palavras-chave:** soro de queijo;  $\beta$ -galactosidase; galactooligossacarídeos (GOS).

## ABSTRACT

The use of agro-industrial residues associated with enzymatic process technology has encouraged the development of new strategies for obtaining bioproducts, such as galactooligosaccharides (GOS). The  $\beta$ -galactosidase enzyme is widely used on production of lactose-free products and, recently, studies on the production of GOS have emerged to take advantage of the main residue of dairy industries – cheese whey. This is a substrate rich in lactose, contributing as an alternative and low-cost source for obtaining GOS, oligosaccharides that act as prebiotics. One way to obtain GOS is using the enzymatic immobilization technique, which allows for several advantages, including the reuse of the biocatalyst, the reduction of maintenance costs and the improvement of thermal stability. In this context, this project aimed to study the use of porungo cheese whey, a dairy product characteristic of the southwest of São Paulo, to produce GOS through the immobilized  $\beta$ -galactosidase enzyme. The work was divided into two moments, in which, in the first, two enzymatic immobilization strategies were evaluated (calcium alginate and calcium alginate-Concanavalin A) in relation to the optimum pH and temperature of the enzyme. In the second moment, obtaining GOS was tested using the most promising immobilization support on different substrates (lactose solution and cheese whey) and then from different concentrations of lactose added to porungo cheese whey (200 g L<sup>-1</sup> to 400 g L<sup>-1</sup>) and temperatures (37 °C to 55 °C). Enzyme immobilization allowed us to verify an increase in the optimal pH range (7.0 to 7.5) for the calcium alginate support when compared to the free enzyme pH range (6.5), while for the calcium alginate support Calcium-Concanavalin A, a greater enzymatic activity was observed at lower pHs (6.0). With respect to temperature, a greater enzymatic activity was observed for the free enzyme in relation to the two immobilization supports tested. Higher GOS yields were observed in porungo cheese whey (63.2%) compared to the lactose solution (41.1%), which was used in the next step to evaluate the process conditions. The maximum GOS yield was 17.73%, with 61.4% lactose conversion, at 46 °C and 400 g L<sup>-1</sup>. These results suggest the possible use of porungo cheese whey as a substrate in the biotechnological production of GOS.

**Keywords:** cheese whey;  $\beta$ -galactosidase; galactooligosaccharides (GOS).

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Diagrama esquemático da hidrólise da lactose e reação de transgalactosilação.....	20
<b>Figura 2.</b> Diagrama de classificação dos métodos de imobilização.....	23
<b>Figura 3.</b> Esquema dos métodos de imobilização de enzimas: confinamento, encapsulação, adsorção (via troca iônica), ligação covalente e reticulação.....	24
<b>ARTIGO 1</b> .....	27
<b>Figure 1.</b> Effect of pH (a) and temperature (b) on free $\beta$ -galactosidase activity (■), immobilized on Ca-alginate (◆) and immobilized on Ca-ConA $\beta$ -galactosidase complex (▲).....	33
<b>Figure 2.</b> Kinetics of galactooligosaccharides (GOS) production from <i>porungo</i> cheese whey (■) and in lactose solution (●) in rotatory shaker at 50 rpm and 37 ° C.....	36
<b>Figure 3.</b> Influence of temperature and <i>porungo</i> cheese whey concentration on galactooligosaccharides (GOS) production in rotatory shaker at 50 rpm. <i>Porungo</i> cheese whey concentration of 200 g L <sup>-1</sup> (▨) and 400 g L <sup>-1</sup> (▩).....	37
<b>Figure 4.</b> Kinetics of galactooligosaccharides (GOS) production in adjusted cheese whey for lactose concentration 200 g L <sup>-1</sup> (a) and lactose concentration adjusted to 400 g L <sup>-1</sup> (b) at temperatures of 37°C (■); 46°C (●); and 55°C (▲).....	38
<b>Figure 5.</b> Kinetics of <i>porungo</i> cheese whey conversion in concentration of 400 g L <sup>-1</sup> at 46°C for $\beta$ -galactosidase reaction products. Lactose (■); glucose (●); galactose (▲); GOS (*).....	39



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>10</b>
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>13</b>
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>14</b>
3.1. Prebióticos.....	14
3.2. Galactooligosacarídeos (GOS): benefícios, tecnologias e mercado.....	16
3.3. Obtenção enzimática de gos.....	18
3.4. Soro de queijo como substrato para obtenção de GOS .....	21
3.5. Imobilização enzimática.....	22
<b>4. ARTIGO 1.....</b>	<b>26</b>
4.1. Introduction .....	27
4.2. Materials and methods .....	29
4.2.1. $\beta$ -galactosidase immobilization .....	29
4.2.2. Activity of free and immobilized $\beta$ -galactosidase .....	30
4.2.3. Optima pH and temperature for free and immobilized $\beta$ -galactosidase .....	30
4.2.4. Galactooligosaccharides (GOS) production .....	31
4.2.5. Analytical methods .....	31
4.3. Results and discussion.....	32
4.3.1. Optima pH and temperature for enzyme activity.....	32
4.3.2. Galactooligosaccharides (GOS) production .....	35
4.4. Conclusion.....	40
4.5. Acknowledgements .....	40
<b>5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>41</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>42</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>49</b>
ANEXO A – E-mail de aceite da publicação na revista Food and Science Technology.....	49
ANEXO B – Artigo publicado na revista Food and Science Technology.....	50

## 1. INTRODUÇÃO

A utilização de subprodutos agroindustriais, tais como o soro de queijo, configura uma alternativa sustentável para a produção biotecnológica de compostos de alto valor agregado, como os galacto-oligossacarídeos (GOS). O setor agroindustrial é caracterizado pela geração de grandes quantidades de resíduos, os quais podem ser utilizados como substrato em bioprocessos, contribuindo com a redução do impacto ambiental e obtenção de biocompostos de alto valor e de interesse comercial (PRAZERES et al., 2012; GABARDO et al., 2014).

A indústria de laticínios produz um dos principais e mais problemáticos resíduos como resultado de seus produtos – o soro do queijo, devido a sua elevada carga orgânica e grande volume gerado (SISO, 1996; DAS et al., 2016). O soro do queijo constitui-se no líquido remanescente após a precipitação e remoção da caseína do leite, por coagulação ácida ou enzimática, durante o processo de fabricação de queijos, e se caracteriza por possuir elevados teores de Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO), que variam na faixa de 30-50 g L<sup>-1</sup>, apresentando grande potencial poluidor se descartado de forma inadequada na natureza (cerca de 100 vezes mais que o esgoto doméstico) (SISO, 1996; GUIMARÃES et al., 2010). Embora apresente-se como um resíduo problemático, se aproveitado de forma adequada, este apresenta um grande potencial de aproveitamento tecnológico, com potencialidade de aplicação em diferentes bioprocessos e na síntese de diversos bioprodutos e biomoléculas, tais como os oligossacarídeos do tipo galacto-oligossacarídeos (GOS) (GABARDO, 2014). O soro de soro de queijo constitui uma fonte alternativa de lactose para a produção de GOS, em que o seu aproveitamento leva a redução dos danos ambientais ocasionados pelo inadequado descarte, assim como a valorização dessa matéria-prima, agregando valor ao produto de interesse. Entre os principais componentes do soro de queijo, encontram-se a lactose (45-50 g L<sup>-1</sup>), proteínas (6-8 g L<sup>-1</sup>) e sais minerais (5-7 g L<sup>-1</sup>), além de apreciáveis quantidades de vitaminas, ácidos orgânicos e aminoácidos (SISO, 1996; GUIMARÃES et al., 2010; PRAZERES et al., 2012).

O queijo porungo apresenta características similares ao do queijo mussarela e é produzido na região sudoeste do estado do São Paulo, sendo um queijo artesanal em que leite cru é utilizado no início do processo, e o soro de leite fermentado é adicionado ao leite para iniciar uma nova produção de queijo (SILVA et al., 2020; PEZZO, 2017). A utilização desse soro consiste em um substrato ainda não explorado, e, portanto, de grande interesse neste projeto, sendo a sua utilização para obtenção de GOS uma alternativa tecnológica.

Os galacto-oligosacarídeos (GOS) constituem-se em uma classe importante de oligossacarídeos de grau alimentar e são classificados como não-digeríveis, atuando como prebióticos e aumentando seletivamente a atividade da microbiota intestinal benéfica para gerar benefícios na saúde (GOSLING et al., 2011). Eles são, em sua maioria, trissacarídeos e podem ser obtidos através da reação de transgalactosilação catalisada pela enzima  $\beta$ -galactosidase (EC 3.2.1.23), comumente conhecida como lactase (FAI e PASTORE, 2015; DAVANI-DAVARI, 2019). De forma geral, os GOS possuem a estrutura Gal<sub>n</sub>-Glc (galactose e glicose, respectivamente), em que *n* indica o grau de polimerização, tipicamente entre 1-5, podendo apresentar diferentes tipos de ligações, como Gal ( $\beta$ 1 $\rightarrow$ 3) Gal ( $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4) Gal ( $\beta$ 1 $\rightarrow$ 6) (NATH et al., 2013; GOSLING et al., 2011). Os GOS podem ser comercializados como misturas de diversos tipos, a depender das condições de processo e do tipo de microrganismo que originou a enzima, que levam à graus de polimerização e tipos de ligação glicosídica diferentes (RASTALL, 2010). Ainda, podem ser encontrados no leite materno de mamíferos nos primeiros meses de amamentação (LAMSAL, 2012).

Como efeitos benéficos da sua ingestão, podem ser citados o aumento da população de bifidobactérias no cólon e a supressão da atividade de bactérias patogênicas, levando à redução da formação de compostos tóxicos do metabolismo (GIBSON e ROBERFROID, 1995; FAI e PASTORE, 2015). Ainda, pode-se citar a contribuição dos prebióticos no equilíbrio da flora intestinal e na prevenção de doenças, como a de *Crohn*, colite ulcerosa, proteção contra infecções do trato urogenital e redução da incidência de câncer colorretal (COLLINS e REIDE, 2016; FAI e PASTORE, 2015). Ainda, este aumento na microbiota favorece a produção de nutrientes importantes, como vitaminas do complexo B (B1, B2, B6 e B12) e ácido fólico; efeito de proteção contra infecções gastrointestinais, urogenitais e respiratórias, devido à inibição da adesão de bactérias maléficas nas superfícies epiteliais; aumento na absorção de diferentes minerais, como ferro, cálcio e magnésio (RASTALL, 2010; ROBERFROID et al., 2010; FAI e PASTORE, 2015).

Tecnologicamente, os GOS possuem estabilidade térmica e química em ampla faixa de pH, podendo ser empregados na elaboração de doces, massas e geleias. Estes prebióticos resistem a 160 °C por 10 min em pH próximo a neutralidade e ainda a 120 °C pelo mesmo período em pH ácido, próximo a 3,0 (MARTINS e BURKET, 2009; LAMSAL, 2012). Além disso, como não são digeríveis, consistem em açúcares de baixo valor calórico, estimado em 1,73 kcal g<sup>-1</sup> (SAKO et al. 1999), sendo cerca de 50% menos calórico que a sacarose, adequando-se a dietas de baixa

ingestão de calorias, o que permite a sua utilização em alimentos para diabéticos (RASTALL, 2010; SAKO et al. 1999).

A produção de GOS a partir da lactose ocorre pela ação da enzima  $\beta$ -galactosidase (EC 3.2.1.23) que, quando na presença de altas concentrações de lactose pode participar de reações de transgalactosilação, em que o aceptor final do grupo  $\beta$ -galactosil passa a ser a própria molécula de lactose ao invés da água (KLEIN et al., 2013; NATH et al., 2013). Neste contexto, o soro de queijo porungo pode ser utilizado como fonte alternativa e sustentável. Uma forma de melhorar a performance do processo de produção de GOS é através da utilização de técnicas de imobilização enzimática. Entre as principais vantagens da técnica encontram-se as melhorias na estabilidade operacional, além de permitir recuperação e reutilização da enzima (GROSOVA et al., 2008). O uso de suportes de baixo custo, tais como alginato (suporte orgânico), consiste em uma alternativa interessante para o uso industrial de enzimas imobilizadas. Este apresenta vantagens como a alta retenção enzimática, resistência a variações de pH e temperatura. Como apresenta baixa estabilidade física, este problema pode ser contornado pelo uso de agentes de reticulação, tais como o glutaraldeído e a concanavalina A (ConA) (HAIDER e HUSAIN, 2007; FREITAS et al., 2011).

Neste sentido, o presente trabalho visou reaproveitar o soro do queijo porungo, um subproduto da agroindústria do sudoeste paulista, a fim de associar a minimização de impactos ambientais causados pelo descarte inapropriado deste resíduo com a concomitante obtenção de um composto da indústria alimentícia de alto valor agregado e que apresenta benefícios a saúde humana, através de técnicas a baixo custo de imobilização de enzimas.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO GERAL

Este trabalho teve como objetivo investigar a produção de galacto-oligossacarídeos (GOS) a partir do aproveitamento de um resíduo agroindustrial da região sudoeste paulista, o soro de queijo porungo, através do uso da enzima  $\beta$ -galactosidase livre e imobilizada.

Mais detalhadamente, **os objetivos específicos são:**

- Comparar o pH e a temperatura ótima da enzima livre e imobilizada nos diferentes suportes de imobilização;
- Avaliar a obtenção de GOS utilizando a enzima imobilizada no suporte mais promissor em solução de lactose e em soro do queijo porungo;
- Avaliar a influência da variação da concentração de lactose e temperatura sobre a obtenção de GOS.

No presente trabalho, encontra-se inicialmente um embasamento teórico relevante ao desenvolvimento da pesquisa, contido nos tópicos de introdução, objetivos e revisão bibliográfica. Os demais tópicos estão apresentados na forma de artigo científico, o qual foi publicado na revista *Food Science and Technology*. Este artigo contém as metodologias empregadas, bem como a descrição dos resultados obtidos, discussões pertinentes e conclusões dos autores.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. Prebióticos

O conceito de prebióticos foi estabelecido pela primeira vez em 1995, por Glenn Gibson e Marcel Roberfroid (GIBSON e ROBERFROID, 1995), como oligossacarídeos não-digeríveis, que estimulavam seletivamente o crescimento e/ou atividade de um número limitado de bactérias no cólon (*Bifidobacterium* spp. e *Lactobacillus* spp.), melhorando assim a saúde do hospedeiro. Nessa definição, apenas alguns carboidratos se classificavam, como por exemplo, os de  $\beta$ -frutanos (fruto-oligossacarídeos e inulina), lactulose e galacto-oligossacarídeos (GOS). A definição foi revisada em 2004, em que três critérios foram estabelecidos para embasar a definição: i) a fermentação por microrganismos intestinais; ii) a capacidade de resistir à digestão do hospedeiro, e iii) o crescimento seletivo das bactérias associadas à saúde e ao bem-estar. Assim, os prebióticos foram definidos como componentes fermentados seletivamente que permitem mudanças específicas na composição e/ou atividade de microrganismos no sistema gastrointestinal (GIBSON et al., 2004). Posteriormente, em 2008, durante a 6ª Reunião Internacional da Associação Científica de Probióticos e Prebióticos (ISAPP, sigla em inglês), esse conceito foi redefinido pelos participantes, em que removeram o critério de seletividade, limitação ao trato gastrointestinal e fermentação, descrevendo os prebióticos como um componente alimentar não-digerível que confere um benefício à saúde do hospedeiro associado a modulação da microbiota (PINEIRO et al., 2008; DAVANI-DAVARI et al., 2019). Contudo, dois anos mais tarde, Gibson et al. (2010) revisaram a definição como sendo um ingrediente fermentado seletivamente que permite mudanças específicas, tanto na composição e/ou atividade da microbiota gastrointestinal que confere benefícios, voltando a aderir a fermentação seletiva como critério. Nessa perspectiva, atualmente, define-se como um substrato que é utilizado seletivamente por microrganismos hospedeiros conferindo benefício à saúde (GIBSON et al., 2017; DAVANI-DAVARI et al., 2019).

Dentre os benefícios observados à saúde do hospedeiro, pode-se citar a contribuição dos prebióticos no equilíbrio da flora intestinal e na prevenção de doenças, como a de *Crohn*, colite ulcerosa, proteção contra infecções do trato urogenital e redução da incidência de câncer colorretal (COLLINS e REIDE, 2016; FAI e PASTORE, 2015). Por não serem digeridos no intestino delgado, ao chegarem no intestino grosso, os prebióticos possuem um metabolismo específico, direcionado às bactérias benéficas, ocasionando mudança acentuada na composição da microbiota

intestinal, fornecendo um ambiente agradável e estimulando seletivamente o crescimento de bactérias benéficas frente às patogênicas. Dessa forma, bactérias com potencial de promoção de saúde tornam-se predominantes (ROBERFROID, 2002; GIBSON et al., 2017; SANDERS et al., 2019). Os prebióticos fornecem fontes de energia para a microbiota intestinal permitindo a modulação da composição e função desses microrganismos (FINT et al., 2007). Isso ocorre a partir da fermentação dos diferentes prebióticos pelas diferentes espécies microrganismos presentes na microbiota intestinal, dependendo do tamanho da cadeia polimérica. Por exemplo, a inulina (grau de polimerização menor que 60) só é fermentada por poucas espécies, enquanto uma grande quantidade de outros microrganismos são capazes de fermentar os fruto-oligossacarídeos (grau de polimerização menor que 10). Além disso, a capacidade de alteração da microbiota está intrinsecamente ligada ao pH do intestino, uma vez que os produtos dessa fermentação são, em sua maioria, ácidos, contribuindo para a mudança do pH do ambiente de 6,5 para 5,5, o que reduz a população de microrganismos basófilos do meio (WALKER et al., 2005; DUNCAN et al., 2009). Durante a degradação dos prebióticos, ácidos graxos de cadeia curta são produzidos, os quais são capazes de se difundir pelos enterócitos do intestino e entrar na circulação sanguínea, favorecendo outros órgãos além dos do trato gastrointestinal, como os do sistema nervoso central, sistema imunológico e cardiovascular (DEN BESTEN et al., 2013). Os ácidos graxos, tais como o butirato, melhoram a biodisponibilidade de minerais como o ferro, magnésio e cálcio, (AHMAD et al., 2021), e quando em alta concentração diminuem o pH intestinal, dificultando o crescimento de bactérias patogênicas, além de favorecerem o crescimento dos microrganismos benéficos, o que reduz a disponibilidade de nutrientes aos microrganismos invasores (SANDERS et al., 2019; SAMANTA et al., 2015). Devido aos benefícios que os prebióticos apresentam e por suas propriedades tecnológicas, como a alta solubilidade e estabilidade operacional quanto aos processamentos, os prebióticos vem ganhando espaço no mercado de alimentos, sendo aplicados em bebidas, produtos lácteos, doces, amiláceos, entre outros (LAMSAL, 2012; TORRES et al. 2010; TZORTZIS e VULEVIC, 2009). Os prébioticos, em sua maioria, são oligossacarídeos não-digeríveis e os mais populares no mercado são os fruto-oligossacarídeos (FOS), galacto-oligossacarídeos (GOS) e a inulina, os quais vêm sendo aplicados em diferentes produtos (LAMSAL, 2012). Os fruto-oligossacarídeos (FOS) são amplamente produzidos em diversos países e aplicados em diferentes produtos, como biscoitos, bebidas, iogurtes, cereais matinais e doces em geral. Eles também podem ser encontrados em diversos alimentos *in natura*, como nos

aspargos, alho e trigo. A inulina configura-se como uma cadeia altamente polimerizada de FOS, contendo pelo menos 10 monômeros de açúcar (COLLINS e REID, 2016). Os GOS são produzidos pelos mecanismos de reação da transgalactosilação por ação da enzima  $\beta$ -galactosidase. Estes são aplicados em bebidas, sobremesas, produtos de padaria, confeitos, gomas de mascar e produtos lácteos, devido às suas características funcionais e tecnológicas, como a alta solubilidade, doçura e índice glicêmico reduzidos e alta estabilidade (LAMSAL, 2012; TORRES et al. 2010; TZORTZIS e VULEVIC, 2009). Enquanto os demais prebióticos aumentam seletivamente o crescimento ou atividade de bactérias benéficas, os GOS também atuam inibindo a adesão de bactérias patogênicas às células que revestem o intestino grosso (SHOAF et al. 2006). Além desses benefícios, os GOS podem ser facilmente aplicados em alimentos a fim de aprimorar a qualidade organoléptica, funcional e nutricional do produto (TORRES et al 2010; SANGWANG et al. 2011).

### **3.2. Galactooligossacarídeos (GOS): benefícios, tecnologias e mercado**

Os galacto-oligossacarídeos (GOS) são uma classe de oligossacarídeos, em sua maioria trissacarídeos, obtidos através da reação de transgalactosilação catalisada pela enzima  $\beta$ -galactosidase (EC 3.2.1.23), comumente conhecida como lactase (FAI e PASTORE, 2015; DAVANI-DAVARI, 2019). De forma geral, os GOS possuem a estrutura Gal<sub>n</sub>-Glc (galactose e glicose, respectivamente), em que  $n$  indica o grau de polimerização, tipicamente entre 1-5, podendo apresentar diferentes tipos de ligações, como Gal ( $\beta$ 1 $\rightarrow$ 3) Gal ( $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4) Gal ( $\beta$ 1 $\rightarrow$ 6) (NATH et al., 2013; GOSLING et al., 2011). Ademais, os GOS oferecem um baixo índice glicêmico, visto que não são hidrolisados pelas enzimas pancreáticas e pelo suco gástrico, portanto, possibilitam seu consumo à indivíduos diabéticos. Além do mais, seu consumo é inerente a diversos benefícios a saúde e prevenção de doenças, uma vez que atuam como prebióticos no organismo do hospedeiro devido a sua indigestibilidade (TZORTZIS e VULEVIC, 2009; FAI e PASTORE, 2015), a qual está atrelada a sua configuração  $\beta$ , pois as enzimas digestivas humanas são específicas para a quebra das ligações  $\alpha$ -glicosídicas. Nesse sentido, ocorre a fermentação dos GOS pela microbiota do intestino, promovendo benefícios fisiológicos a saúde do hospedeiro (DAVIS et. al. 2010; FANARO et. al. 2009). Como exemplo desses efeitos, pode-se citar a supressão de espécies patogênicas pelo crescimento da população de bifidobactérias e decréscimo do pH pela produção de ácidos graxos de cadeia curta. Este aumento na microbiota ainda favorece



a produção de nutrientes importantes, como vitaminas do complexo B (B1, B2, B6 e B12) e ácido fólico; efeito de proteção contra infecções gastrointestinais, urogenitais e respiratórias, devido à inibição da adesão de bactérias maléficas nas superfícies epiteliais; aumento na absorção de diferentes minerais, como ferro, cálcio e magnésio (RASTALL, 2010; ROBERFROID et al., 2010; FAI e PASTORE, 2015). Segundo Vulevic et al. (2015), a ingestão de GOS por adultos aumentou os níveis sanguíneos de leucócitos (interleucina 8 e 10) e da proteína C-reativa (PCR), produzida pelo fígado em função de uma resposta inflamatória, além da contribuição positiva na função das células natural *killers* (NK), essenciais para o sistema imunológico inato. No sistema nervoso, foi demonstrado efeito regulatório em neurotransmissores e fatores neurotróficos (FORSYTHE et al, 2014; SAVIGNAC et al., 2013; WILLIAMS et al, 2016).

Devido a sua estabilidade térmica e química em ampla faixa de pH, os GOS podem ser utilizados na elaboração de doces, massas e geleias. Estes prebióticos resistem a 160 °C por 10 min em pH próximo a neutralidade e ainda a 120 °C pelo mesmo período em pH ácido, próximo a 3,0 (MARTIN e BURKET, 2009; LAMSAL, 2012). Além disso, como não são digeríveis, estes consistem em açúcares de baixo valor calórico, estimado em 1,73 kcal g<sup>-1</sup> (SAKO et. al. 1999), sendo cerca de 50% menos calórico que a sacarose, adequando-se a dietas de baixa ingestão de calorias, o que permite a sua utilização em alimentos para diabéticos (RASTALL, 2010; SAKO et al. 1999). Nesta perspectiva, os GOS podem ser empregados como substitutos de baixa capacidade cariogênica, por exemplo, uma vez que, diferentemente do amido e açúcares simples, eles não são consumidos pela microbiota bucal, o que desfavorece a produção de compostos cariogênicos, como os ácidos ou poliglucanos (TORRES et al., 2010; SANGWAN et al., 2011; LAMSAL, 2012). Ainda, este prebiótico apresenta características físico-químicas favoráveis a sua aplicação em bebidas, uma vez que possui excelente solubilidade (> 80%), colaborando para a estabilidade do produto; não possui cor aparente; viscosidade em temperatura ambiente (20°C) é de 2700 mPa.s, possibilitando uma consistência mais cremosa e suave ao produto (SANGWAN et al, 2011; LAMSAL, 2012). Um exemplo desta aplicação foi reportada por Van Leusen et al. (2014), o qual constatou o perfil sensorial de iogurte com e sem adição de GOS, observando que o iogurte com adição apresentou-se mais cremoso, mais doce (devido a presença de glicose nos GOS) e sensação mais preenchida na boca em comparação ao produto sem a adição deste prebiótico. Além disso, sua viscosidade em baixas concentrações de GOS (1% - 5%) não altera de forma substancial a viscosidade global do produto. Assim, essa adição não terá efeito de espessamento ou aumento de

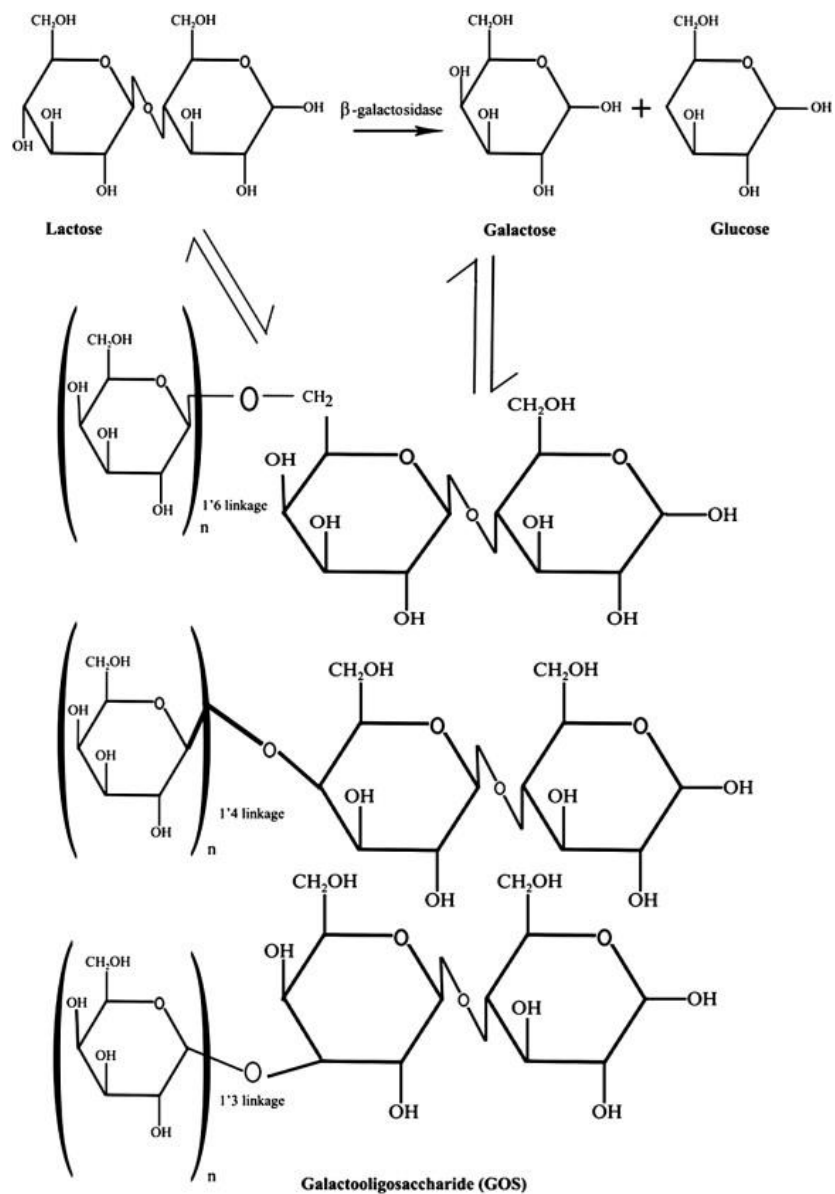
volume, o que configura uma vantagem à indústria por possibilitar a utilização do GOS em seus produtos sem a necessidade de modificar o processo produtivo ou suas embalagens. Ainda, Belsito et al. (2017) adicionaram GOS na formulação de requeijão cremoso, produto obtido pela fusão entre massa coalhada de queijo por coagulação ácida e/ou enzimática, cozida ou não, escorrida ou lavada, apresentando consistência final que pode ser espalhada com uma faca a temperatura ambiente. Esse estudo demonstrou que a adição de GOS em todas as concentrações (1,5%, 3% e 4% em gramas) na formulação tornou a estrutura do produto mais densa e reduziu a quantidade e tamanho dos glóbulos de gordura do produto. Em questões reológicas, as concentrações de 3% e 4% favoreceram a melhora na maciez e espalhabilidade do produto, demonstrada pelo decréscimo da viscosidade aparente, do módulo elástico e viscoso e aumento do índice de fusão. Além disso, a adição de GOS afetaram positivamente o aroma e o sabor do requeijão, demonstrando ser um produto potencialmente interessante para o mercado (BELSITO et al., 2017).

Os GOS podem ser comercializados como misturas de diversos tipos, a depender das condições de processo e do tipo de microrganismo que originou a enzima, que levam à graus de polimerização e tipos de ligação glicosídica diferentes. Alguns exemplos podem ser citados, dentre eles o Oligomate 55, BiMuno Vivinal GOS e Cup-Oligo. O primeiro se constitui numa mistura de 36% de tri-, tetra-, penta-, e hexa-galacto-oligossacarídeos, oriundos da enzima  $\beta$ -galactosidase de *Aspergillus oryzae* e *Streptococcus thermophilus*, 16% de dissacarídeos (galactosil-glicose e galactosil-galactose), 38% de monossacarídeos e 10% de lactose (CRITTENDEN e PLAYNE, 1996; RASTALL, 2010). Já o Cup-Oligo, produzido pela empresa japonesa Nissin Sugar, é obtido a partir de *Cryptococcus laurentii* e composto em sua maioria por GOS com ligações do tipo  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4), assim como o Vivinal GOS, proveniente da empresa holandesa Friesland Campina. O BiMuno, por sua vez, foi lançado recentemente pela empresa Clasado Ltda., contendo 52% de GOS com ligações  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3) e xarope, obtido de  $\beta$ -galactosidase de *Bifidobacterium bifidum* (RASTALL, 2010).

### **3.3. Obtenção enzimática de GOS**

Os galacto-oligossacarídeos (GOS) podem ser obtidos por reações de transgalactosilação catalisadas por  $\beta$ -galactosidasas oriunda de diferentes fontes, tais como leveduras, fungos e bactérias. A  $\beta$ -galactosidase catalisa a reação de transgalactosilação através dos seus dois resíduos

de ácido glutâmico (Glu482 ou Glu551) que atuam como doadores de prótons e como nucleófilos simultaneamente na reação enzimática (ZHOU e CHEN, 2001). As altas concentrações de lactose são necessárias, uma vez que o acceptor final do grupo  $\beta$ -galactosil passa a ser a própria molécula de lactose ao invés da água. A alta temperatura também influencia na alta solubilidade da lactose e redução da atividade de água do meio, favorecendo a reação de transgalactosilação frente à hidrólise, devido à falta de moléculas de água livre como acceptoras finais de resíduos de galactose (GOSLING et al., 2010; 2011). A reação enzimática ocorre em três etapas (Figura 1): primeiramente a ocorre a formação do complexo enzima-galactose e a liberação simultânea da glicose. Em seguida, o complexo enzima-galactose é transferido para acceptores contendo um grupo hidroxil. Em soluções com baixa concentração de lactose, a água é mais competitiva para ser o acceptor final deste complexo, resultando na formação de galactose. Já em soluções concentradas de lactose, o sacarídeo e demais di e trissacarídeos podem atuar como acceptor e se ligar ao complexo enzima-galactose resultando na formação de GOS (ZHOU e CHEN, 2001; FAI e PASTORE, 2015). Diversas são as origens da enzima  $\beta$ -galactosidase, podendo ser encontrada em vegetais, órgãos de animais e microrganismos (fungos filamentosos, bactérias e leveduras), sendo estes últimos os de maior interesse (GROSOVA et al., 2008; SANTIAGO, 2004; TOMAL et al.; 2010; FAI e PASTORE, 2015). Algumas espécies desses microrganismos são *Bifidobacterium bifidum*, *Kluveromyces lactis*, *Bacillus circulans* e *Sulfolobus solfataricus* (PATEL e GOYAL, 2011). Por esse motivo, existe uma variedade de diferentes tipos de GOS formados por essa reação de acordo com o microrganismo fornecedor da enzima. Um exemplo disso são os GOS produzidos por *K. lactis* que apresentam-se, preferencialmente, com ligações  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6), enquanto que os produzidos por *B. circulans* produz predominantemente GOS com ligações  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) entre os açúcares (GOSLING et al., 2011; NATH et al., 2013). Nessa perspectiva, o potencial prebiótico de cada GOS depende da composição dos monossacarídeos, do grau de polimerização e do tipo de ligação glicosídica (CRUZ-GUERRERO et al., 2014).



**Figura 1.** Diagrama esquemático da hidrólise da lactose e reação de transgalactosilação. **Fonte:** NATH et al., 2013.

Neste contexto, a temperatura e concentração de lactose são alguns dos parâmetros que necessitam ser controlados, visto que a enzima β-galactosidase catalisa também a reação de hidrólise dos GOS formados (GOSLING et al., 2010; 2011). Rendimentos típicos de produção de GOS encontram-se na faixa de 30% a 40%, sendo o máximo reportado na literatura de 52 %, a partir de β-galactosidase de *Sulfolobus solfataricus*, a partir de 600 g L<sup>-1</sup> de lactose, temperatura de 80 °C e pH de 6,0 (PARK et al., 2008). As condições ótimas de produção geralmente variam entre 37 °C a 80 °C, concentração de lactose de 270 g L<sup>-1</sup> a 600 g L<sup>-1</sup> e pH próximo a neutralidade

(FAI e PASTORE, 2015). Urrutia (2013) relatou que seu maior rendimento (26,8%) foi alcançado em pH mais ácido (4,5) e na concentração enzimática de 15 U mL<sup>-1</sup> em 40 °C, utilizando a β-galactosidase produzida por *A. oryzae*. Nesse estudo, esse resultado foi comparado com os rendimentos de GOS utilizando a enzima de outra fonte microbiana, o que demonstrou que para β-galactosidase de origem de *K. lactis*, o rendimento foi de 40% a mais, com tendência a produzir, preferencialmente, GOS de ligações β-(1→6). Ainda nessa perspectiva, segundo Fara et al. (2020), a produção de GOS a partir de 300 g L<sup>-1</sup> de lactose (45°C e pH 6,5), chegou a 38,1% de rendimento após 24h, a partir de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus*, sendo compostos principalmente por trissacarídeos de ligações β-(1 → 6), e β-(1 → 3). Santos et al. (2009) relatou que as condições ótimas de rendimento de GOS foram 45 °C, 10 U mL<sup>-1</sup> de concentração enzimática no tempo de 12h em pH 5,0, alcançando rendimento de 80,8 mg mL<sup>-1</sup> de oligossacarídeos (na forma de 4'galactosyl-lactose).

Considerando que a lactose é o substrato para a obtenção de GOS, a utilização de resíduos agroindustriais, constitui em uma alternativa e sustentável para a produção do prebiótico, voltando a atenção ao soro de queijo – principal resíduo da indústria laticinista (SISO, 1996; GUIMARÃES et al., 2010). Esse subproduto apresenta potencialidade de aplicação em diferentes bioprocessos, na síntese de bioprodutos e biomoléculas, tais como os GOS. Este aproveitamento permite associar a redução dos danos ambientais ocasionados pelo inadequado descarte, com a obtenção de biomolécula de alto valor agregado, de forma sustentável (SISO, 1996; GUIMARÃES et al., 2010; PRAZERES et al., 2012; GABARDO et al., 2014, 2016).

### **3.4. Soro de queijo como substrato para obtenção de GOS**

O soro de queijo se caracteriza como o líquido remanescente após a precipitação e remoção da caseína do leite, por coagulação ácida ou enzimática, durante o processo de fabricação de queijos. Este apresenta elevada Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO), que variam na faixa de 30-50 g L<sup>-1</sup>, e por isso, tem potencial poluidor aproximadamente 100 vezes maior que o esgoto doméstico (SISO, 1996; GUIMARÃES et al., 2010; PRAZERES et al., 2012; DAS et al., 2016).

Em 2020, o Brasil produziu cerca de 760 milhões de toneladas de queijo, o que representa cerca de 6,8 bilhões de toneladas de soro de queijo, considerando uma média de 9 L de soro a cada

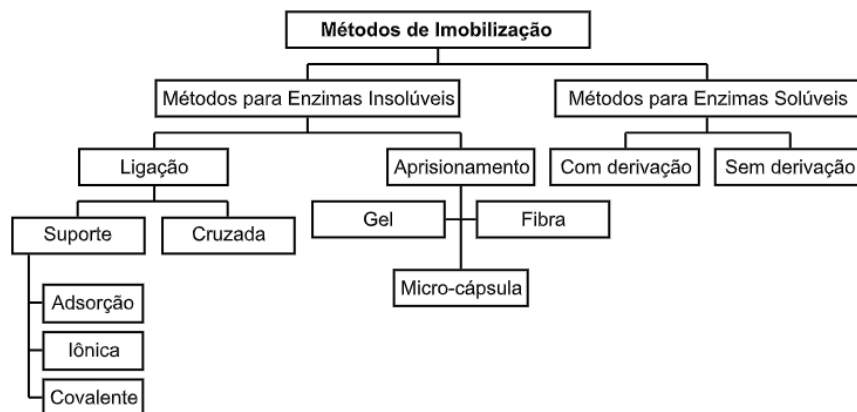
1 kg de queijo produzido (MAPA, 2021). Esse volume chama a atenção para a oportunidade de reaproveitamento desse subproduto, o qual apresenta um grande potencial de aproveitamento tecnológico (GABARDO et al., 2014). Na região sudoeste do estado de São Paulo, o queijo porungo é produzido por diversas famílias localizadas nas cidades da região, como as de Campina do Monte Alegre, Buri e Angatuba e apresenta características similares ao do queijo mussarela (PEZZO, 2017; SILVA et al., 2020). O porungo é um queijo artesanal tradicionalmente fabricado por produtores com leite cru onde no processo de produção, o soro de leite fermentado é adicionado ao leite para iniciar uma nova produção de queijo. Este queijo contém uma grande população de bactérias lácticas responsáveis por suas características de aspecto e sabor (PEZZO, 2017; SILVA et al., 2020). A utilização desse soro de queijo consiste em um substrato ainda não explorado, e, portanto, de grande interesse.

Apesar do soro do queijo ser o principal e mais problemático resíduo da indústria de laticínios, uma vez que possui elevada carga orgânica e grande volume gerado, o descarte inadequado vem sendo oportunamente abandonado, visto que além dos prejuízos ambientais e perdas econômicas para a indústria, este apresenta grande potencial de aproveitamento devido a sua composição rica em nutrientes, contendo entre os principais componentes a lactose (45 a 50 g L<sup>-1</sup>), proteínas (6 a 8 g L<sup>-1</sup>) e sais minerais (5 a 7 g L<sup>-1</sup>) (SISO, 1996; GUIMARÃES et al., 2010; PRAZERES et al., 2012; DAS et al., 2016; NUNES et al. 2018). Apesar de 50 % de todo soro de queijo que é gerado ser utilizado na indústria farmacêutica e alimentícia, o restante é remanescente, necessitando de um destino adequado. Uma forma de valorizar esse subproduto é através do uso em bioprocessos (SISO, 1996; GUIMARÃES et al., 2010; PRAZERES et al., 2012; DAS et al., 2016). Dessa forma, o soro de queijo apresenta potencialidade de aplicação na síntese de diversos bioprodutos e biomoléculas, tais como fonte de substrato alternativa, não onerosa para obtenção mais sustentável de GOS. A lactose contida neste substrato deve estar solubilizada a fim de que esteja disponível para ser consumida pela reação enzimática. Nesse sentido, é possível aumentar a sua solubilidade pela elevação da temperatura (18,9% a 25°C, 25,2% a 40°C e 37,3% a 60°C), favorecendo a reação de transgalatosilação e, conseqüentemente, a síntese de GOS, devido à maior disponibilidade do substrato (MARTINS E BURKERT, 2009; OSMAN, 2016).

### **3.5. Imobilização enzimática**

A técnica de imobilização enzimática é uma importante ferramenta que permite a melhoria na estabilidade operacional do processo, permitindo a recuperação e reutilização da enzima, proteção contra inativação enzimática causada pela temperatura e solventes orgânicos (GROSOVA et al., 2008; PANESAR et al., 2010). Além disso, a imobilização facilita a separação da enzima do meio reacional, reduzindo a possibilidade de contaminação no produto (SHELDON e VAN PELT, 2013). Devido ao elevado custo de biocatalisadores, a utilização industrial de enzimas era até pouco tempo atrás economicamente inviável, o que levou a comunidade científica das décadas passadas a direcionarem seus estudos sobre a técnica de imobilização de enzimas para reutilização (MARCONI, 1989). Em 1969, foi relatado pela primeira vez a aplicação industrial de enzimas imobilizadas, no Japão (TAKASAKI et al. 1969), realizando a isomerização da glicose em frutose por glicose isomerase. Ainda, em 1976, Chibata e Tosa (1976) investigaram a resolução óptica de aminoácidos com aminoácido acilase.

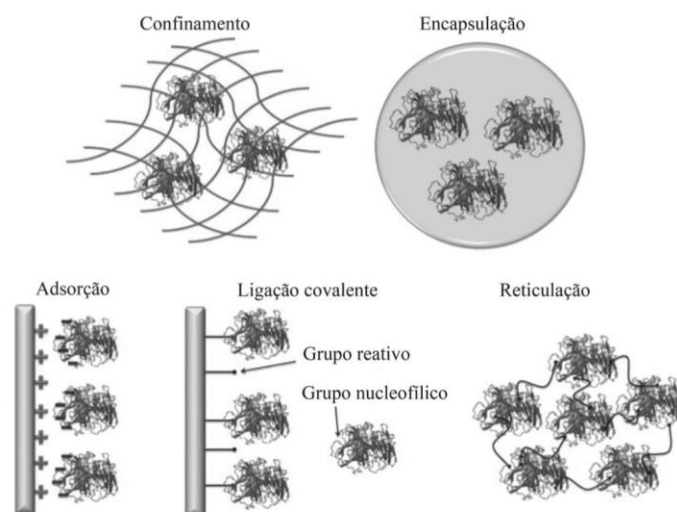
O sistema no qual a enzima será imobilizada deve ser previamente escolhido, uma vez que dependendo do suporte, cada método possui suas especificidades e limitações (FERNANDES et al., 2010). Alguns métodos de imobilização foram propostos por Kennedy e White (1986), levando em consideração a natureza da interação e do suporte utilizado (Figura 2).



**Figura 2.** Diagrama de classificação dos métodos de imobilização. **Fonte:** KENNEDY e WHITE, 1986.

Alguns tipos de imobilização são empregados para a  $\beta$ -galactosidase, dentre eles podemos citar adsorção física, aprisionamento (ou confinamento) e por ligação covalente (Figura 3). A primeira consiste em um método simples na qual a enzima é imobilizada em um suporte

hidrofóbico e a reação enzimática ocorre na sua superfície por ações de forças físicas – de Van der Waals (PANESAR et al., 2010). Um exemplo dessa utilização foi realizado por Serio et al., 2003, no qual a  $\beta$ -galactosidase originária de *K. marxianus* foi imobilizada em diferentes suportes óxidos (alumina, sílica e alumina silicada), no qual observou-se que a atividade enzimática é extremamente dependente da natureza química do suporte. A técnica de aprisionamento possui vantagens na sua simplicidade de obtenção, uma vez que basta gotejar uma suspensão polimérica de células em um meio contendo íons carregados positivamente ou através de polimerização térmica para se obter esferas estáveis e transparentes (como as de alginato, por exemplo) (SOUZA, 2017). Assim, essa técnica consiste no aprisionamento físico da enzima em um pequeno espaço, chamado de matrizes de imobilização (PANESAR et al., 2010). Segundo Haider e Husain (2009), a imobilização da  $\beta$ -galactosidase proveniente de *A. oryzae* em um complexo esférico formado por alginato de cálcio e concavalina-A apresentou atividade máxima em 60 °C, cerca de 10 °C acima da atividade máxima da enzima livre, demonstrando o poder protetor da imobilização. Por fim, a técnica de imobilização por ligação covalente consiste em reter as enzimas na superfície de um suporte pela formação de ligações covalentes, através de grupos funcionais amino, carboxil, hidroxil e sulfidril, a depender da enzima, realizando a reação sempre na presença de seu substrato ou um inibidor competitivo para que haja a proteção dos sítios ativos do grupo funcional e possibilite a ligação enzima-suporte (PANESAR et al., 2010). Em estudos, foi possível observar que a enzima proveniente de *E. coli* imobilizada em sílica-alumina foi mais estável em pH ácido quando comparada a sua forma livre (HERNAIZ e CROUT, 2000).





**Figura 3.** Esquema dos métodos de imobilização de enzimas: confinamento, encapsulação, adsorção (via troca iônica), ligação covalente e reticulação. **Fonte:** Modificada de Fernández-Fernández et al. (2013).

Dentre as diversas técnicas de imobilização, a de aprisionamento foi a empregada no presente estudo, o qual foi realizado aprisionando a molécula de enzima dentro de uma matriz polimérica de alginato de cálcio, possibilitando a entrada do substrato e a saída do produto, mas não da enzima. Essa técnica pode ser sub-classificada de acordo com os materiais utilizados: gel (ágar, poliácridamida, gelatina e alginato); fibra (acetato de celulose); e em microcápsulas (membranas poliméricas) (FERNANDES et al., 2010). Para que a imobilização ocorra é necessário fazer uso dos suportes de imobilização, os quais variam os materiais, entre eles, o uso de alginato, o qual apresenta baixo custo e vantagens operacionais para o processo, tais como a alta retenção enzimática, resistência a variações de pH e temperatura. Entretanto, para aumentar a estabilidade física, o uso de agentes de reticulação, como a concavalina A (ConA) e gluteraldeído, é uma alternativa a fim de contornar esse entrave (HAIDER e HUSAIN, 2007; FREITAS et al., 2011).

O procedimento de imobilização em matriz de alginato consiste em gotejar a solução de alginato com a enzima dissolvida nesta em uma solução aquosa contendo íons bivalentes, como por exemplo o cálcio ( $\text{Ca}^{+2}$ ) que, quando em contato, formam através da gota esferas de alginato de cálcio na qual a enzima fica aprisionada. Esse processo ocorre devido as interações iônicas entre blocos de gluronato (presente na composição do alginato) e íons cálcio, favorecendo a formação de um gel forte e termoestável (LIMA et al., 2001; STORKER et al., 1991). Na literatura reportada por Mörschbacher et al. (2016), a imobilização de  $\beta$ -galactosidase oriunda de *Kluveromyces lactis* em esferas de alginato de cálcio se mostrou promissora no teor de hidrólise da lactose presente no soro do queijo, com conversão máxima de 72%. Ainda, Freitas et al. (2011) imobilizaram a enzima  $\beta$ -galactosidase de *A. oryzae* em alginato, demonstrando que esta permaneceu estável na faixa de pH de 4,5 a 7 e a temperatura ótima da enzima aumentou 5°C quando comparada a enzima livre. Panesar et al. (2007) imobilizaram as células de *K. marxianus* NCIM 3465 (microorganismo produtor de  $\beta$ -galactosidase) em matriz de gel de alginato, reportando 87,9% de hidrólise da lactose do meio para 30 °C e 150 minutos de procedimento, o que verifica a aplicação bem sucedida da imobilização de células ou enzimas para tais fins. Esses resultados exemplifica que a técnica de imobilização é uma ferramenta significativa no aumento do rendimento de reações enzimáticas,

embora um estudo mais aprofundado seja necessário para que a conversão reacional alcance os 100% (MÖRSCHBÄCHER et al., 2016).

#### 4. ARTIGO 1

Este artigo foi publicado na revista *Food Science and Technology*, em 05 de Março de 2021 (ANEXO B), no correspondente doi: <https://doi.org/10.1590/fst.64520>.

Biotechnological production of galactooligosaccharides (GOS) using *porungo* cheese whey

##### **Abstract**

The bioconversion of *porungo* cheese whey into galactooligosaccharides (GOS) was investigated using immobilized  $\beta$ -galactosidase in batch system. Two enzymatic immobilization strategies were tested for optima pH and temperature and the best immobilization strategy was used to evaluate the GOS production in two steps. First, different lactose sources (substrates) were tested, and subsequently, different concentrations of *porungo* cheese whey ( $200 \text{ g L}^{-1}$  and  $400 \text{ g L}^{-1}$ ) and temperatures ( $37 \text{ }^\circ\text{C}$  to  $46 \text{ }^\circ\text{C}$ ) were evaluated. Immobilization of  $\beta$ -galactosidase increased the range of operational pH (7.0- 7.5) when immobilized in calcium-alginate support. However, the pH range decreased when the immobilization was conducted using calcium-Concanavalin A support. Batch reactions using the calcium-alginate immobilized biocatalyst produced the highest yields of GOS (63.2 %) from *porungo* cheese whey, compared to the control substrate of lactose solution at concentration of  $50 \text{ g L}^{-1}$  (41.1 %). The temperature of  $46 \text{ }^\circ\text{C}$  and  $400 \text{ g L}^{-1}$  of substrate shown the better condition to GOS production, with lactose conversion of 61.4%. These results

suggest the possible use of *porungo* cheese whey as substrate in the biotechnological production of GOS.

**Key words:** agro-industrial residues; galactooligosaccharides; immobilized enzyme; whey;  $\beta$ -galactosidase.

**Practical Application:** Porungo cheese whey is a potential agro-industrial by-product to obtain GOS.

#### 4.1. Introduction

The utilization of agro-industrial residues, such as cheese whey, as an alternative and cheap substrate in the bioprocess to obtain biomolecules has been researched in the generation of added-values products, such as galactooligosaccharides (GOS), important prebiotics used in the food industry. Agro-industrial sector is characterized by generating high amounts of residues, which can be used in bioprocesses, reducing their environmental impact and allowing to obtain value-added commercial products of interest (Laufenberg et al. 2003; Christensen et al. 2011, Gabardo et al. 2014, González-Martínez et al. 2002).

Cheese whey is a dairy industrial residue, possessing a high organic load in terms of BOD (Biochemical Oxygen Demand), which is produced in large volumes, thus being characterized as potentially polluting stream (Siso 1996, Prazeres et al. 2012, Guimarães et al. 2010, Das et al. 2016). The improper discharge of these residues also represents a major economic loss for the dairy industry since approximately half of the production is disposed in wastewater treatment plants or used as by-products for animal feed (Guimarães et al. 2010, Prazeres et al. 2012, Das et

al. 2016). On the other hand, because of its unique chemical composition, cheese whey has the potential to be used in bioprocess, consisting as a rich substrate for GOS production because of its high lactose content (45–50 g L<sup>-1</sup>). Porungo cheese, which is a local type of cheese produced by farmers located in the southwest of the state of São Paulo, Brazil, has similar characteristics to mozzarella cheese, but the whey produced in this process has so far found no applications (Pezzo 2017).

In bioprocess, cheese whey can be used as an alternative source of lactose, the substrate of  $\beta$ -galactosidase enzyme (EC 3.2.1.23) for the biosynthesis of GOS. Classified as non-digestible dietary fiber by the human organism, this oligosaccharide act as a prebiotic and selectively increase beneficial intestinal microflora activity to generate health benefits (Gosling et al. 2011). Beneficial effects of GOS ingestion include the increase in the colon bifidobacterial population and the suppression of pathogenic bacteria activity, leading to the reduction of toxic metabolism formation (Gibson and Roberfroid, 1995, Fai and Pastore, 2015).

$\beta$ -galactosidase performs transgalactosylation reactions in high lactose concentration media and high temperatures, producing galactooligosaccharides by transferring galactosyl residues to lactose molecules (Klein et al. 2013; Nath et al. 2013). One way to improve the performance of this process is using enzymatic immobilization techniques. Among the main advantages of the technique are improvements in the operational stability and allowing enzyme recovery and reuse (Grossova et al. 2008). The use of low cost supports such as alginate is an interesting alternative for the industrial use of immobilized enzymes. This support has advantages such as high enzymatic retention, resistance to pH and temperature variations. As it has low physical stability, this problem can be overcome using crosslinking agents, such as glutaraldehyde and concanavalin A (ConA) (Haider & Husain 2007; Freitas et al. 2011).

In the light of these considerations, the aims of this research was to investigate the biosynthesis of galactooligosaccharides (GOS) derived from porungo cheese whey, using immobilized  $\beta$ -galactosidase. This substrate has not been explored before in bioprocess. Different supports of immobilization were tested, and the reaction was optimized concerning the substrate concentration and temperature.

## **4.2. Materials and methods**

### ***4.2.1. $\beta$ -galactosidase immobilization***

The *Kluyveromyces lactis*  $\beta$ -galactosidase enzyme, Maxilact LGi 5000 (DSM of Brazil), was donated by Global Food Company (São Paulo, SP) in liquid formulation, with a declared activity of  $\geq 5000$  Natural Lactase Unit (NLU) per gram of commercial enzyme. The immobilization of  $\beta$ -galactosidase was carried out in two different ways: 1) using calcium alginate (Ca-alginate) as inert support; and 2) calcium alginate treated with Concanavalina-A (Ca-ConA), following the methodology described by Mörschbacher et al. (2016). The diluted enzyme was added to 5 % sodium alginate solution to a final enzyme activity of 250 U per mL of alginate. This mixture was dripped in to a 0.05 M calcium chloride solution ( $\text{CaCl}_2$ ) using a needle-coupled syringe ( $6 \times 0.25$  mm). Afterward, the formed beads (2.49 mm) were gently agitated for 30 min and kept in contact with this solution for 1 h, at 4 °C to stabilize the system. The beads were then rinsed with a 0.1 M potassium phosphate buffer solution (pH 7.0) to be used in subsequent experiments. The Ca-ConA was prepared through the addition of 4 mg of ConA for each mL of diluted enzyme. Then, this complex was added in to a 5 % sodium alginate solution to a final enzyme activity of 250 U per mL of alginate and this mixture was dripped in 0.05 M calcium chloride solution ( $\text{CaCl}_2$ ) through

a needle-coupled syringe ( $6 \times 0.25$  mm). The beads were agitated for 30 min and kept in contact with this solution as described above.

#### ***4.2.2. Activity of free and immobilized $\beta$ -galactosidase***

The determination of free  $\beta$ -galactosidase activity was carried out using ONPG (o-nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranoside) as substrate, according to the methodology described by Klein et al. (2013). The reaction occurred from 50  $\mu$ L of the diluted enzyme and 0.5 mL of activity buffer composed of 0.1 M potassium phosphate buffer and 1.5 mM magnesium chloride solution ( $\text{MgCl}_2$ ) containing 10 mM ONPG for 2 min. The activity for  $\beta$ -galactosidase immobilized was determined from a volume of spheres equal to 50  $\mu$ L (total of 7 beads). The reactions were stopped by the addition of 0.1 M of sodium carbonate-bicarbonate buffer (pH 10). The o-nitrophenol (ONP) released was determined using spectrophotometer at 415 nm. One unit of enzymatic activity (U) was defined as the amount of enzyme required to release 1  $\mu$ mol of o-nitrophenol per minute, under analysis conditions.

#### ***4.2.3. Optima pH and temperature for free and immobilized $\beta$ -galactosidase***

The optimum pH for free and immobilized  $\beta$ -galactosidase was evaluated from 0.1 M potassium phosphate buffer solution containing 1.5 mM magnesium chloride solution ( $\text{MgCl}_2$ ) at 37°C, varying the pH from 5.5 to 8.0. Likewise, the temperature for free and immobilized  $\beta$ -galactosidase was evaluated ranging from 10 °C to 70 °C, at pH 7.0. The reaction occurred using 50  $\mu$ L (free  $\beta$ -galactosidase) or 7 beads (immobilized  $\beta$ -galactosidase) and 0.5 mL of activity buffer containing 10 mM ONPG for 2 min.

#### **4.2.4. Galactooligosaccharides (GOS) production**

The synthesis of GOS was carried out in two steps. Firstly, different substrates were tested, and subsequently, different concentrations of *porungo* cheese whey and temperatures were evaluated, both using the Ca-alginate support. The first step was performed using two different substrates: 1) lactose 50 g L<sup>-1</sup> diluted in 0.1M phosphate buffer (pH 7.0), or 2) *porungo* cheese whey (pH 7.0). Whey proteins were hydrolyzed with commercial protease (Alcalase 2.4 L, 2.4 UA-A g<sup>-1</sup>, Tovani Benzaquen Ingredients, São Paulo, Brazil), at pH 8.5, 55 °C for 3 h. This procedure was carried out to avoid protein precipitation during the GOS production process. The GOS production was conducted in conical flasks of 125 mL containing 8 mL of immobilized  $\beta$ -galactosidase and 20 mL of substrate. The temperature and the agitation were controlled in an orbital shaker at 50 rpm and 37 °C, in a time reaction of 180 min. Duplicate samples were collected periodically and immediately placed in ice bath to stop the reaction. The second experimental step was conducted using *porungo* cheese whey containing different lactose concentrations (200 g L<sup>-1</sup> and 400 g L<sup>-1</sup>) and under different temperatures (37 °C, 46 °C and 55 °C). The tests were conducted in conical flasks of 125 mL containing 8 mL beads with immobilized  $\beta$ -galactosidase in 20 mL in an orbital shaker at 50 rpm, during 180 min. Duplicate samples were collected periodically and subjected to ice bath to stop the enzymatic reaction.

#### **4.2.5. Analytical methods**

Analysis of galactooligosaccharides (GOS) and monosaccharides was performed by High Performance Liquid Chromatography (HPLC), (Shimadzu, Aminex HPX-87C column (300 x 7.8 mm)), according to the methodology described by Klein et al. (2013). The samples were centrifuged (3000  $\times$  g for 15 min) and the supernatant was filtered on cellulose-acetate membrane

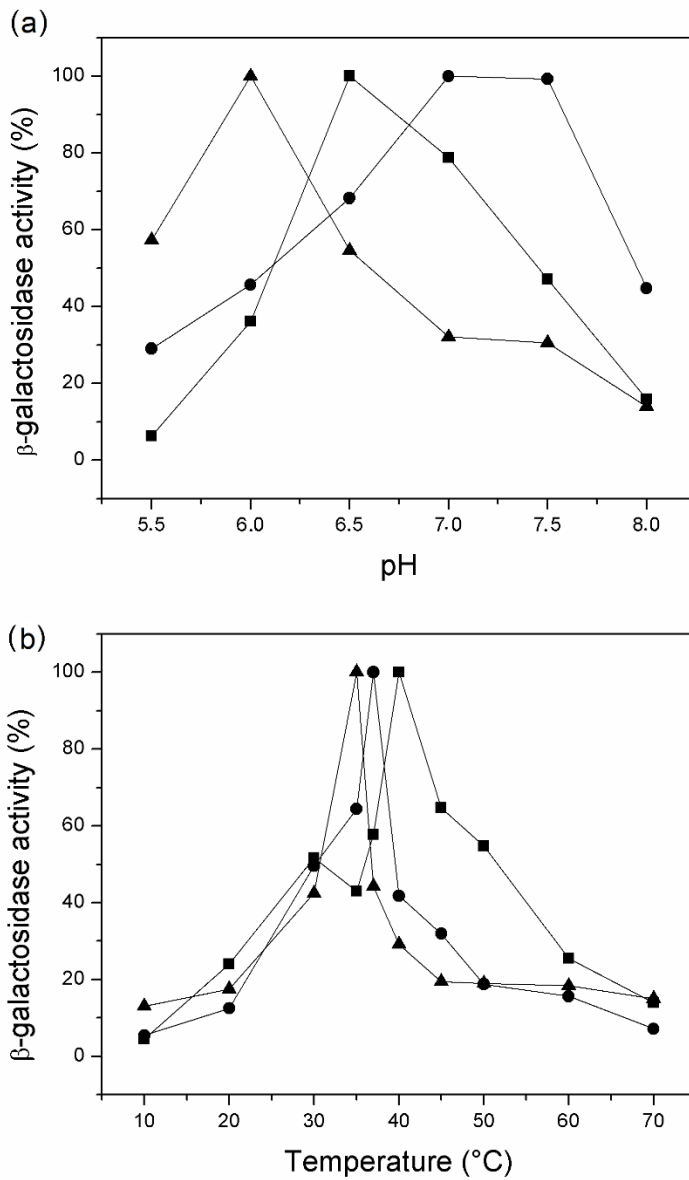
(0.22  $\mu\text{m}$ ). Ultrapure water was used as eluent at a flow rate of 0.6 mL min<sup>-1</sup> at 85 °C. Standards for lactose, glucose and galactose were used. GOS concentrations were calculated as raffinose equivalents from an external raffinose standard. The GOS yield (%) was defined as the percentage of GOS produced compared with the weight of initial lactose in the reaction medium; lactose conversion (%) was defined as a relation of lactose consumption in the reaction with its initial concentration.

### **4.3. Results and discussion**

#### ***4.3.1. Optima pH and temperature for enzyme activity***

The effect of pH and temperature on the relative activity of the free and immobilized  $\beta$ -galactosidases are represented in Figure 1.





**Figure 1.** Effect of pH (a) and temperature (b) on free  $\beta$ -galactosidase activity (■), immobilized on Ca-alginate (◆) and immobilized on Ca-ConA  $\beta$ -galactosidase complex (▲).

Immobilization in Ca-alginate extended the optimum pH range of the enzyme to a broader range of 6.5 to 7.5 when compared with optimum pH of the free enzyme (Figure 1a). Using this

immobilization support, the enzyme activity was increased to a more acidic pH (5.5 and 6.0), with more than 45% of the activity remaining at pH 6, compared to 36% for to free enzyme. This might be due to the protection effect provided by the immobilization support, allowing operational stability (Grosova et al. 2008). In Ca-ConA support, a higher enzymatic activity was observed in lower pH (6.0). The optimal pH range shift to an acidic value agrees with reports by Huang et al. (1996), who studied the enzyme  $\beta$ -galactosidase immobilized on silanized glass beads. In their research, the enzymatic activity was determined in the pH range of 4.0 to 9.0 and temperature from 20 °C to 60 °C, presenting a similar behavior found in our work, when compared to free enzyme (pH 7.0). The authors observed the same behavior in relation to the optimum temperature, in which the higher activity was found at lower temperature (40 °C) for immobilized enzyme compared to the free form (45 °C). However, the support Ca-ConA did not perform satisfactorily for the enzymatic activity when compared to Ca-alginate support, as it led to lower enzymatic activity values (less than 54%), being even lower than those observed for free enzyme. This effect was observed at pH 7.0, under which the relative enzymatic activity was 79% for free enzyme, compared to 32% in Ca-ConA. In Ca-alginate support, maximum enzymatic activity was observed for pH ranging from 7.0 to 7.5, corresponding to 100% of relative enzymatic activity.

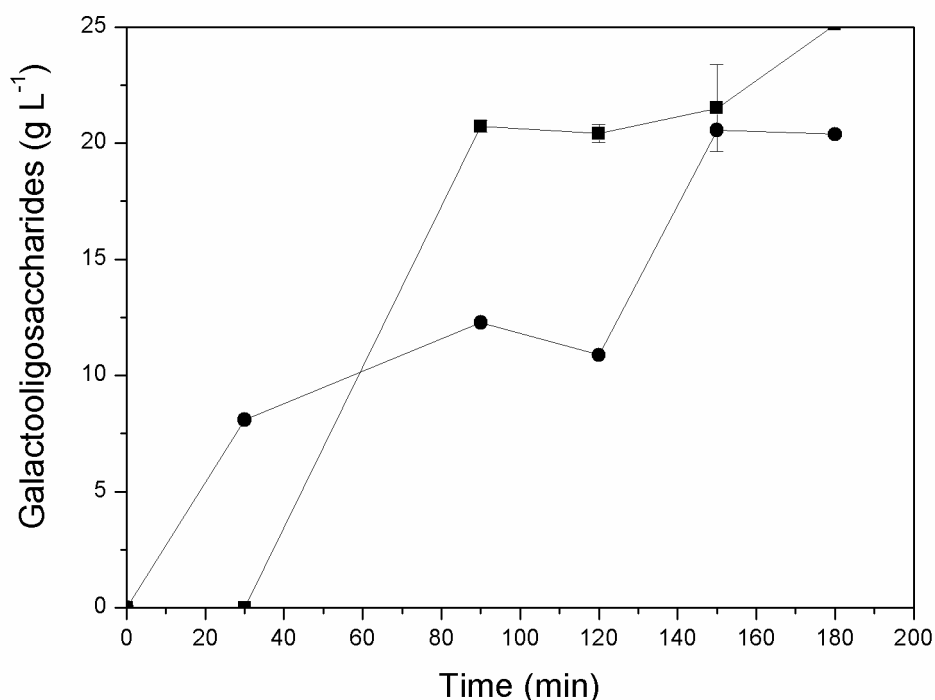
The effect of temperature on enzymatic activity is shown in Figure 1b. The maximum activity for the immobilized  $\beta$ -galactosidase is obtained at about 37°C and 35°C in Ca-alginate and Ca-ConA, respectively, compared to 40°C for the free enzyme. Surprisingly, the temperature range for the immobilized enzyme on the two immobilization supports tested was narrower than the free enzyme range, a somewhat not expected behavior because the intent of the immobilization is to give greater protection to the enzyme, and consequently, to provide increased enzymatic activity under more extreme conditions. Escobar et al. (2014), also verified a higher enzymatic activity of

free  $\beta$ -galactosidase compared to the Ca-alginate immobilized enzyme when investigating the lactose hydrolysis in whey permeate. An explanation for this can be explained based on diffusional effects, which produces resistances to mass transfer in the matrix of immobilization. Enzyme immobilization in alginate systems enables several interesting features, such as high biocatalytic density. However, the main limitation of this technique is the diffusional barrier of substrates and products through the gel matrix. High enzyme density can also difficult the contact of enzyme and substrate in the inner environment of the beads, again causing limitations of mass transfer (Gabardo et al. 2011; Pilkington et al. 1998). In this context, Ca-alginate support was the most promising support observed in this research, since it provided an increase of the range of the relative enzymatic activity. In this sense, Ca-alginate was the support used to conduce the testes of GOS production.

#### ***4.3.2. Galactooligosaccharides (GOS) production***

The study of galactooligosaccharides (GOS) production was carried out in two steps. In the first, different lactose sources (substrates) were evaluated. Subsequently, different concentrations and temperatures were evaluated. Galactooligosaccharides are non-digestible oligosaccharides, used as prebiotics in food ingredients, and its regular consumption can promote the growth of beneficial intestinal microbiota (*Lactobacilos* sp and *Bifidobacterium* sp), which are associated with positive health effects when applied in human diets (Grosova et al. 2008). The kinetics of galactooligosaccharides synthesis from porungo cheese whey and lactose solution 50 g L<sup>-1</sup> is shown in Figure 2. Porungo cheese is an artisanal cheese manufactured using raw milk and contain 4.3% of lactose concentration according previous studies carried out by our group (Coelho et. al. 2020 *in press*), being able as a potential and alternative source of carbon to GOS production. The

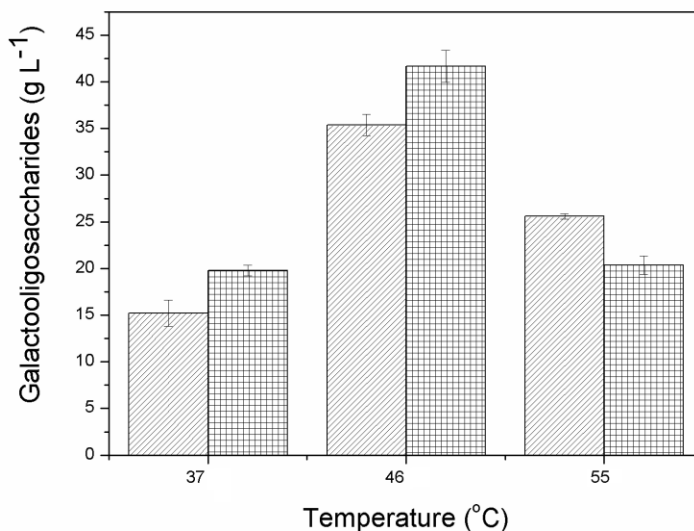
galactooligosaccharides synthesis from porungo cheese whey was higher than that observed for lactose solution, reaching yields of 63.1% compared to 41.1%, respectively. Moreover, the kinetics of GOS production from lactose solution was slower, with productivity of  $8.2 \text{ g (h L)}^{-1}$  in 90 min of reaction, while the productivity from porungo cheese whey was  $13.6 \text{ g (h L)}^{-1}$ , which demonstrates the potential biotechnological use of porungo cheese whey to synthesize GOS.



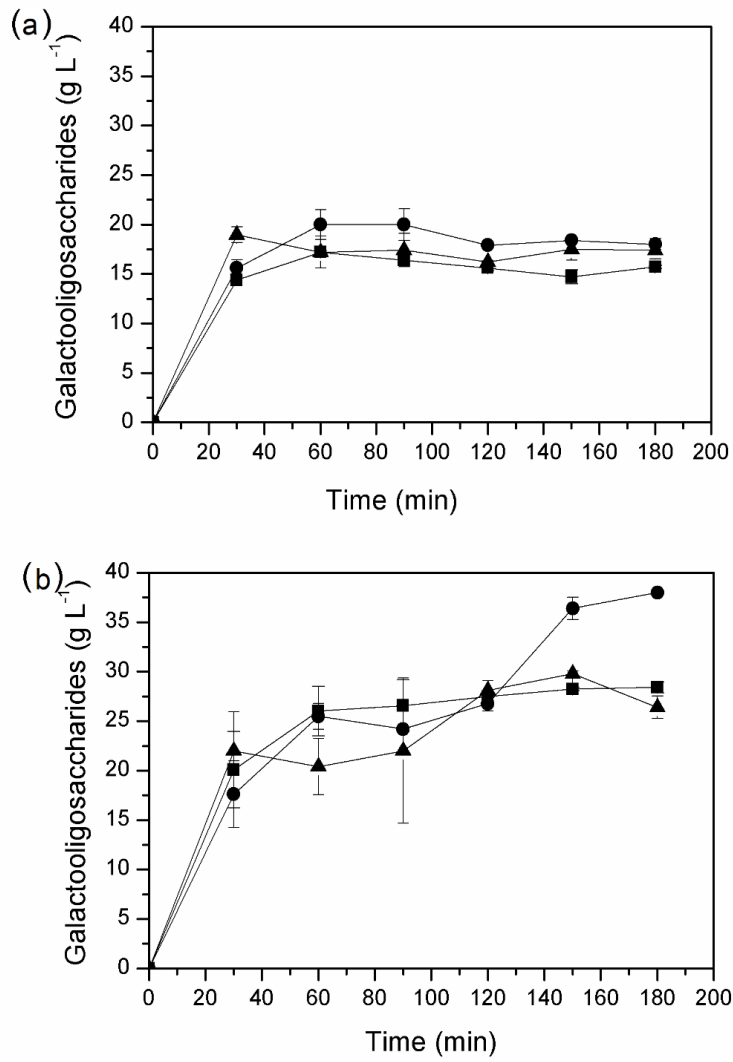
**Figure 2.** Kinetics of galactooligosaccharides (GOS) production from *porungo* cheese whey (■) and in lactose solution (●) in rotatory shaker at 50 rpm and 37 °C.

In the second step of experiments, the highest GOS synthesis was observed from porungo cheese whey with lactose concentration of  $400 \text{ g L}^{-1}$  and temperature of 46°C (Figure 3). This behavior was similar to those found by Dos Santos et al. (2009), who studied the production of galactooligosaccharides from *Scopulariopsis* sp. at temperatures of 35°C, 45°C and 60°C, using

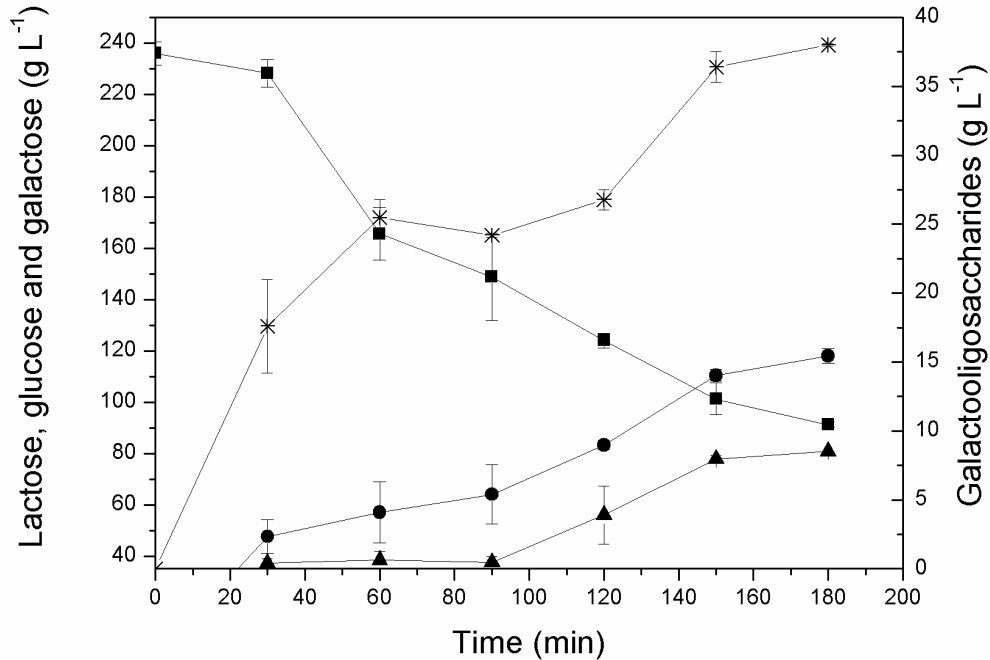
40% of lactose concentration and free enzyme (10 U mL<sup>-1</sup>), obtaining a better performance at 45°C, reaching a GOS yield of 20%. However, according to Urrutia (2013), higher GOS values were found using  $\beta$ -galactosidase of *K. lactis*, reaching a maximum yield of 42% from 400 g L<sup>-1</sup> of lactose and the free enzyme concentration of 15 U mL<sup>-1</sup>. The maximum GOS yield was 17.6% in whey concentration of 200 g L<sup>-1</sup> (Figure 4a) and 17.7% in whey concentration of 400 g L<sup>-1</sup> (Figure 4b), at temperature of 46°C. It is observed an increase in GOS production from 120 min of reaction under the condition of 400 g L<sup>-1</sup> and 46 °C (Figure 4b), indicating longer required reaction time to reach highest values of bioconversion, a fact represented by Figure 5, which shows 100 g L<sup>-1</sup> residual lactose, indicating that it was not fully consumed in the reaction. Moreover, in Figure 5, it can be observed that the lactose was converted not only into GOS but also in its monosaccharides, confirming the potential of the enzyme for reactions of hydrolysis and in the transgalactosylation (Fai and Pastore 2015).



**Figure 3.** Influence of temperature and *porungo* cheese whey concentration on galactooligosaccharides (GOS) production in rotatory shaker at 50 rpm. *Porungo* cheese whey concentration of 200 g L<sup>-1</sup> (hatched) and 400 g L<sup>-1</sup> (cross-hatched).



**Figure 4.** Kinetics of galactooligosaccharides (GOS) production in adjusted cheese whey for lactose concentration 200 g L<sup>-1</sup> (a) and lactose concentration adjusted to 400 g L<sup>-1</sup> (b) at temperatures of 37°C (■); 46°C (●); and 55°C (▲).



**Figure 5.** kinetics of *porungo* cheese whey conversion in concentration of 400 g L<sup>-1</sup> at 46°C for  $\beta$ -galactosidase reaction products. Lactose (■); glucose (●); galactose (▲); GOS (\*).

The GOS produced in this work was a trisaccharide. The yield of GOS obtained in this work is similar to what was reported by Martínez-Villaluenga (2008), who found yields of 20% of GOS 3 (trisaccharide) under reaction conditions between 40°C and 50°C using  $\beta$ -galactosidase obtained from *K. lactis*. In general, reaction products (GOS) have the structure Gal<sub>n</sub> – Glc, where n indicates the degree of polymerization, typically between 1 to 5, and may have different types of bonds, such as Gal ( $\beta$ 1  $\rightarrow$  3), Gal ( $\beta$ 1  $\rightarrow$  4), and Gal ( $\beta$ 1  $\rightarrow$  6) (Nath *et al.* 2013; Gosling *et al.* 2011). Moreover, besides the possibility of different types of GOS formed for the same enzyme, when they are obtained by different microorganisms, they can also influence the type of bonding and degree of polymerization obtained. *K. lactis*  $\beta$ -galactosidase is characterized by producing GOS ranging from disaccharides to tetrasaccharides; *Aspergillus oryzae*  $\beta$ -galactosidase produces

GOS ranging from disaccharides to hexasaccharides; and *Bacillus circulans*  $\beta$ -galactosidase have produced GOS ranging from disaccharides to pentasaccharides (Frenzel et al. 2015; Gosling et al. 2011).

#### **4.4. Conclusion**

The Ca-alginate immobilization technique increased the optimal pH range of  $\beta$ -galactosidase and the thermal stability of immobilized  $\beta$ -galactosidase positively influences the operating conditions in the present work, since the transgalactosylation reaction is favored at high temperatures. The yields obtained for GOS demonstrated the ability to use *porungo* cheese whey in this bioprocess, being a maximum yield at 46 °C and *porungo* cheese whey concentration of 400 g L<sup>-1</sup>. In this context, it is evidenced the biotechnological potential of *porungo* cheese whey in the synthesis of GOS, which is a promising alternative carbon source, allowing the use of agro-industrial by-product from the dairy industry to obtain added-value biomolecules to be used in the food industry.

#### **4.5. Acknowledgements**

The authors wish to thank CNPq and UFSCar (Brazil) for the financial support of this research and scholarships for the first author.



## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os galacto-oligosacarídeos (GOS) são oligossacarídeos de característica prebiótica, capazes de agregar diversos benefícios à saúde do hospedeiro, através do equilíbrio da microbiota intestinal, prevenindo doenças, estimulando a produção de vitaminas e associação de minerais, bem como contribuindo positivamente ao sistema imunológico e nervoso. Esses prebióticos ainda possuem facilidades tecnológicas relevantes na aplicação em alimentos, como sua inserção em bebidas, produtos lácteos, doces, produtos de confeitaria, entre outros, devido sua alta estabilidade térmica e química, sem que sofram danos durante os processos de fabricação ou tratamentos térmicos.

A produção dos GOS é realizada pela enzima  $\beta$ -galactosidase a partir da lactose e a sua imobilização permite a reutilização em processos sequenciais, podendo levar a maior estabilidade operacional. Isso foi observado de forma mais significativa no suporte de alginato de cálcio, que aumentou a faixa de pH ótimo da  $\beta$ -galactosidase – uma vantagem importante em relação a enzima na forma livre. Nesta perspectiva, para que a técnica de imobilização seja bem-sucedida, deve avaliar a capacidade de retenção, custos, limitações e viabilidade técnica. Dito isso, observa-se que o suporte de Ca-alginato consistiu no método mais promissor para este trabalho, possuindo um baixo custo e simples de ser empregado.

Em relação ao rendimento da produção de GOS, os melhores valores foram obtidos na temperatura de 46 °C e concentração de lactose ajustada para 400 g L<sup>-1</sup>, o que demonstra que a enzima atua melhor em altas concentrações de lactose. Neste sentido, é evidenciado o potencial biotecnológico do soro de queijo porungo para a síntese de GOS, o qual se constitui em uma fonte alternativa de carbono promissora, permitindo o aproveitamento de um subproduto agroindustrial da indústria de laticínios para a obtenção de biomoléculas com potencial de uso na própria indústria alimentícia. Isso contribui economicamente para a empresa e ambientalmente ao meio ambiente, uma vez que o soro do queijo, resíduo altamente poluidor, deixa de comprometer os corpos hídricos com seu descarte inadequado e passa a ser aproveitado e comercializado como prebiótico pelas indústrias alimentícias.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BELSITO, P. C. et al. Manufacture of Requeijão cremoso processed cheese with galactooligosaccharide. **Carbohydrate Polymers**, v. 174, p. 869-875, 2017.

CHIBATA, Ichiro; TOSA, Tetsuya. Industrial applications of immobilized enzymes and immobilized microbial cells. In: **Applied biochemistry and bioengineering**. Elsevier, 1976. p. 329-357.

COLLINS, Stephanie; REID, Gregor. Distant site effects of ingested prebiotics. **Nutrients**, v. 8, continuous bioreactors. **Renewable Energy**, v. 69, p. 89-96, 2014.

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

CRUZ-GUERRERO, Alma et al. Commercial probiotic bacteria and prebiotic carbohydrates: a fundamental study on prebiotics uptake, antimicrobials production and inhibition of pathogens. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 94, n. 11, p. 2246-2252, 2014.

DAS, M; RAYCHAUDHURI, A; GHOSH, S.K. Supply Chain of Bioethanol Production from Whey: A Review. **Procedia Environmental Sciences**, v. 35, p. 833 – 846, 2016.

DAVANI-DAVARI, Dorna et al. Prebiotics: definition, types, sources, mechanisms, and clinical applications. **Foods**, v. 8, n. 3, p. 92, 2019.

DAVIS, L. M. G. et al. A dose dependent impact of prebiotic galactooligosaccharides on the intestinal microbiota of healthy adults. **International Journal of Food Microbiology**, v. 144, n. 2, p. 285-292, 2010.

DEN BESTEN, G.; VAN EUNEN, K.; GROEN, A.K.; VENEMA, K.; REIJNGOUD, D.-J.; DUNCAN, S.H.; LOUIS, P.; THOMSON, J.M.; FLINT, H.J. The role of pH in determining the species composition of the human colonic microbiota. **Environ. Microbiol.**, v. 11, p. 2112–2122, 2009.

FAI, A.E.C; PASTORE, G.M. Galactooligosacarídeos: produção, benefícios à saúde, aplicação em alimentos e perspectivas. **Scientia Agropecuaria**, v.6, p. 69 – 81, 2015.

FANARO, Silvia et al. Galacto-oligosaccharides are bifidogenic and safe at weaning: a double-blind randomized multicenter study. **Journal of pediatric gastroenterology and nutrition**, v.48, n. 1, p. 82-88, 2009.

FERNANDES, KÁTIA F.; LIMA, CLAUDINEI S.; LOPES, FLAVIO M. Técnicas de imobilização de enzimas. **Revista Processos Químicos**, v. 4, n. 7, p. 53-58, 2010.

FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, Maria; SANROMÁN, M. Ángeles; MOLDES, Diego. Recent developments and applications of immobilized laccase. **Biotechnology advances**, v. 31, n. 8, p. 1808-1825, 2013.

FORSYTHE, P.; BIENENSTOCK, J.; KUNZE, W. A. Vagal pathways for microbiome-brain-gut axis communication. **Microbial endocrinology: the microbiota-gut-brain axis in health and disease**, p. 115-133, 2014.

FREITAS, F.; MARQUEZ, L.D.S.; RIBEIRO, G. P.; BRANDÃO, G.C.; CARDOSO, V.L.; RIBEIRO, E.J. A comparison of the kinetic properties of free and immobilized *Aspergillus oryzae*  $\beta$ -galactosidase. **Biochemical Engineering Journal**, v.58– 59, p.33– 38, 2011.

from whey and whey permeate by immobilized strains of *Kluyveromyces marxianus* in batch and

GABARDO, S.; RECH, R.; ROSA, C. A.; & AYUB, M. A. Z. Dynamics of ethanol production

GABARDO, Sabrina et al. Dynamics of yeast immobilized-cell fluidized-bed bioreactors systems in ethanol fermentation from lactose-hydrolyzed whey and whey permeate. **Bioprocess and biosystems engineering**, v. 39, n. 1, p. 141-150, 2016.

GIBSON GR; ROBERFROID MB. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. **Journal of Nutrition**. v. 125, p. 1401–12, 1995.

GIBSON, G. R. et al. Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. **Nutrition Research Reviews**, v. 17, p. 259-275, 2004.

GIBSON, G. R. et al. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. **Nature reviews Gastroenterology & hepatology**, v. 14, n. 8, p. 491-502, 2017.

GIBSON, G.R.; SCOTT, K.P.; RASTALL, R.A.; TUOHY, K.M.; HOTCHKISS, A.; DUBERT-FERRANDON, A.; GAREAU, M.; MURPHY, E.F.; SAULNIER, D.; LOH, G.; et al. Dietary prebiotics: Current status and new definition. **Food Sci. Technol. Bull. Funct. Foods.**, v.7, p. 1–19, 2010.

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

GOSLING, Aaron et al. Effect of the substrate concentration and water activity on the yield and rate of the transfer reaction of  $\beta$ -galactosidase from *Bacillus circulans*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 7, p. 3366-3372, 2011.

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

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

HAIDER, T.; HUSAIN, Q. Calcium alginate entrapped preparations of *Aspergillus oryzae*  $\beta$ -galactosidase: Its stability and applications in the hydrolysis of lactose. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 41 p. 72–80, 2007.

HERNAIZ, Maria J.; CROUT, David HG. Immobilization/stabilization on Eupergit C of the  $\beta$ -galactosidase from *B. circulans* and an  $\alpha$ -galactosidase from *Aspergillus oryzae*. **Enzyme and microbial technology**, v. 27, n. 1-2, p. 26-32, 2000.

KENNEDY, J. F.; WHITE, C. A. Handbook of enzyme biotechnology. ed. A. Wiseman, 1985.

KLEIN, M. P.; FALLAVENA, L.P.; SCHÖFFER, J. N.; AYUB, M. A. Z.; RODRIGUES, R. C; INOW, J. L.; HERTZ, P. F. High stability of immobilized  $\beta$  -galactosidase for lactose hydrolysis and galactooligosaccharides synthesis. **Carbohydrate Polymers**, v. 95, p. 465 – 470, 2013.

LAMSAL, B. P. Production, health aspects and potential food uses of dairy prebiotic galactooligosaccharides. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 92(10), p. 2020–2028, 2012.

MARCONI, Walter. Immobilized enzymes: their catalytic behaviour and their industrial and analytical applications. **Reactive polymers**, v. 11, p. 1-19, 1989.

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

MARTINS, André Rosa; BURKERT, Carlos André Veiga. Revisão: Galacto-oligossacarídeos (GOS) e seus efeitos prebióticos e bifidogênicos. **FURG**. 2009.

MINISTÉRIO DE AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO - MAPA. Relatórios de produtos por UF. Brasília: **MAPA**, 2017. Mimeografado.

MÖRSCHBÄCHER, A. P.; VOLPATO, G.; & SOUZA, C. F. V. D. *Kluyveromyces lactis*  $\beta$ -galactosidase immobilization in calcium alginate spheres and gelatin for hydrolysis of cheese whey lactose. **Ciência Rural**, v. 46, n. 5, p. 921-926, 2016.

NATH, A.; BHATTACHARJEE, C.; CHOWDHURY, R. Synthesis, and separation of galactooligosaccharides using membrane bioreactor. **Desalination**, v. 316, p. 31– 41, 2013.

NUNES, Luane Alcântara et al. O soro do leite, seus principais tratamentos e meios de valorização. **Revista em Agronegócio e Meio Ambiente**, v. 11, n. 1, p. 301-326, 2018.

OSMAN, Ali et al. Synthesis of prebiotic galactooligosaccharides from lactose using bifidobacterial  $\beta$ -galactosidase (BbgIV) immobilised on DEAE-Cellulose, Q-Sepharose and amino-ethyl agarose. **Biochemical engineering journal**, v. 82, p. 188-199, 2014.

PANESAR, P. S., KUMARI, S., PANESAR, R. Potential applications of immobilized  $\beta$ -galactosidase in food processing industries. **Enzyme research**, v. 2010, 2010.

PARK, Ha-Young et al. Galactooligosaccharide production by a thermostable  $\beta$ -galactosidase from *Sulfolobus solfataricus*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, n. 8, p. 1553-1558, 2008.

PATEL, S.; GOYAL, A. Functional oligosaccharides: Production, properties and applications. **World J. Microbiol. Biotechnol.** v. 27, p. 1119–1128, 2011.

PEZZO M. Porungo: Queijo tradicional da Região do Campus Lagoa do Sino está no centro de parceria entre pesquisadores e produtores locais. **Revista da Universidade Federal de São Carlos (UFSCAR)** v. 2, p. 36-42, 2017.

PINEIRO, M., ASP, N. G., REID, G., MACFARLANE, S., MORELLI, L., BRUNSER, O., TUOHY, K. FAO Technical meeting on prebiotics. **Journal of clinical gastroenterology**, v. 42, p. S156-S159, 2008.

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

RASTALL, R. A. Functional Oligosaccharides: Application and Manufacture. In: DOYLE, M. P. e KLAENHAMMER, T. R. (Ed.). **Annual Review of Food Science and Technology**, v.1, p.305-339, 2010.

ROBERFROID, M. Functional food concept and its application to prebiotics. **Digestive and Liver Disease**, v. 34, p. S105-S110, 2002.

ROBERFROID, M., GIBSON, G. R., HOYLES, L., MCCARTNEY, A. L., RASTALL, R., ROWLAND, I., MEHEUST, A. Prebiotic effects: metabolic and health benefits. **British Journal of Nutrition**, v. 104, n. S2, p. S1-S63, 2010.

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.

SANGWAN V.; TOMAR S.K.; SINGH R.R.B.; SINGH A.K. AND ALI B. Galactooligosaccharides: novel components of designer foods. **Journal of Food Science**, v. 76, p.103–111, 2011.

SANTIAGO, P.A; MARQUEZ, L.D.S; CARDOSO, V.L; RIBEIRO, E.J. Estudo da produção da  $\beta$ -galactosidase por fermentação de soro de queijo com *Kuyveromyces marxianus*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 4, p. 567-572, 2004.

SANTOS, R. D.; SIMIQUELI, A. P. R.; & PASTORE, G. M. Produção de galactooligossacarídeo por *Scopulariopsis* sp. **Food Science and Technology**, v. 29, n. 3, p. 682-689, 2009.

SAVIGNAC, H.M.; CORONA, G.; MILLS, H.; CHEN, L.; SPENCER, J.P.; TZORTZIS, G.; BURNET, P.W. Prebiotic feeding elevates central brain derived neurotrophic factor, n-methyl-d-aspartate receptor subunits and d-serine. **Neurochem. Int.**, v. 63, p. 756–764, 2013.

SERIO, M. Di.; MATURO, C.; ALTERIIS, E.De.; PARASCANDOLA, P.; TESSER, R.; SANTACESARIA, L. Lactose hydrolysis by immobilized  $\beta$ -galactosidase the effect of the supports and the kinetics. **Catalysis Today**, v. 79-80, p. 333-339, 2003.

SHELDON, R. A.; VAN PELT, S.. Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 15, p. 6223-6235, 2013.

SHOAF K.; MULVEY G.L.; ARMSTRONG G.D.; AND HUTKINS R.W. Prebiotic galactooligosaccharides reduce adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to tissue culture cells. **Infection and Immunity**, v. 74, p. 6920–6928, 2006.

SILVA, N.F.N., AGUIAR, K.S., PIMENTEL FILHO, N.J., FERREIRA, I.E.P., TROIANI, C.A.L., TRIBST, A.A.L., CARVALHO, A.F. Milk quality, production process and physicochemical characteristics of Porungo, an artisanal cheese from the state of Sao Paulo, Brazil. **Journal of Dairy Research**, v.87, n. 4, p. 480-483, 2020.

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

SOUZA, Livia TA et al. Imobilização enzimática: princípios fundamentais e tipos de suporte. 2017.

TAKASAKI, Y.; KOSUGI, Y.; KANBAYASHI, A. Fermentation advances. **by D. Perlman, Academic Press Inc.**, New York, p. 561, 1969.

TOMAL A.A.B; DA CUNHA, M.E.T; BOSSO, A; YOUSSEF, A.W; SUGUIMOTO, E.H. Avanços Tecnológicos na Obtenção, Purificação e Identificação de Galactooligossacarídeos e Estudo de suas Propriedades Prébióticas. Unopar Científica. **Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 12, p. 41-49, 2010.

TORRES, D.P.M.; GONÇALVES, M.P.F.; TEIXEIRA, J.A.; AND RODRIGUES, L.R. Galactooligosaccharides: Production, properties, applications, and significance as prebiotics. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 9, p. 438–454, 2010.

TZORTZIS, G.; VULEVIC, J. Galacto-oligosaccharide prebiotics. **Prebiotics and probiotics science and technology**, p. 207, 2009.

URRUTIA, P.; RODRIGUEZ-COLINAS, B.; FERNANDEZ-ARROJO, L.; BALLESTEROS, A. O.; WILSON, L.; ILLANES, A.; & PLOU, F. J. Detailed analysis of galactooligosaccharides synthesis with  $\beta$ -galactosidase from *Aspergillus oryzae*. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 61, n.5, p. 1081-1087, 2013.

VAN LEUSEN, E., TORRINGA, E., GROENINK, P., KORTLEVE, P., GEENE, R., SCHOTERMAN, M., & KLARENBEEK, B. Industrial applications of galactooligosaccharides. Food oligosaccharides: **Production, analysis, and bioactivity**, p. 470-491. 2014.

VULEVIC, J. et al. Influence of galacto-oligosaccharide mixture (B-GOS) on gut microbiota, immune parameters and metabonomics in elderly persons. **British Journal of Nutrition**, v. 114, n. 4, p. 586-595, 2015.

WALKER, A.W.; DUNCAN, S.H.; LEITCH, E.C.M.; CHILD, M.W.; FLINT, H.J. Ph and peptide supply can radically alter bacterial populations and short-chain fatty acid ratios within microbial communities from the human colon. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 71, p. 3692–3700, 2005.

WILLIAMS, S.; CHEN, L.; SAVIGNAC, H.M.; TZORTZIS, G.; ANTHONY, D.C.; BURNET, P.W. Neonatal prebiotic (bgos) supplementation increases the levels of synaptophysin, glun2a-subunits and bdnf proteins in the adult rat hippocampus. **Synapse.**, 70, 121–124, 2016.

ZHOU, Q. Z. K.; CHEN, X. D. Effects of temperature and pH on the catalytic activity of the immobilized beta-galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 9, p. 33-40, 2001.



## ANEXOS

### ANEXO A – E-mail de aceite da publicação na revista *Food and Science Technology*.

De: Adriano Cruz <[onbehalf@manuscriptcentral.com](mailto:onbehalf@manuscriptcentral.com)>

Date: seg., 14 de dez. de 2020 às 19:20

Subject: Food Science and Technology - Decision on Manuscript ID CTA-2020-0645.R1

To: <[sabrinagabardo@ufscar.br](mailto:sabrinagabardo@ufscar.br)>

14-Dec-2020

Dear Dr. Gabardo:

It is a pleasure to accept your manuscript entitled "Biotechnological production of galactooligosaccharides (GOS) using porungo cheese whey" in its current form for publication in the Food Science and Technology. The comments of the reviewer(s) who reviewed your manuscript are included at the foot of this letter.

Thank you for your fine contribution. On behalf of the Editors of the Food Science and Technology, we look forward to your continued contributions to the Journal.

Sincerely,

Dr. Adriano Cruz

Editor-in-Chief, Food Science and Technology

[food@globo.com](mailto:food@globo.com)

Associate Editor


Comments to the Author:

(There are no comments.)

Entire Scoresheet:



## Biotechnological production of galactooligosaccharides (GOS) using *porungo* cheese whey

Lais Saldanha BOLOGNESI<sup>1</sup>, Sabrina GABARDO<sup>2\*</sup> , Paulo Roberto DALL CORTIVO<sup>3</sup>,  
Marco Antônio Záchia AYUB<sup>3</sup>

### Abstract

The bioconversion of *porungo* cheese whey into galactooligosaccharides (GOS) was investigated using immobilized  $\beta$ -galactosidase in batch system. Two enzymatic immobilization strategies were tested for optima pH and temperature and the best immobilization strategy was used to evaluate the GOS production in two steps. First, different lactose sources (substrates) were tested, and subsequently, different concentrations of *porungo* cheese whey (200 g L<sup>-1</sup> and 400 g L<sup>-1</sup>) and temperatures (37 °C to 46 °C) were evaluated. Immobilization of  $\beta$ -galactosidase increased the range of operational pH (7.0-7.5) when immobilized in calcium-alginate support. However, the pH range decreased when the immobilization was conducted using calcium-Concanavalin A support. Batch reactions using the calcium-alginate immobilized biocatalyst produced the highest yields of GOS (63.2%) from *porungo* cheese whey, compared to the control substrate of lactose solution at concentration of 50 g L<sup>-1</sup> (41.1%). The temperature of 46 °C and 400 g L<sup>-1</sup> of substrate shown the better condition to GOS production, with lactose conversion of 61.4%. These results suggest the possible use of *porungo* cheese whey as substrate in the biotechnological production of GOS.

**Keywords:** agro-industrial residues; galactooligosaccharides; immobilized enzyme; whey;  $\beta$ -galactosidase.

**Practical Application:** Porungo cheese whey is a potential agro-industrial by-product to obtain GOS.