



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA**

GUILHERMINA SCHULTZ

**MODELAGEM CINÉTICA DA SÍNTESE DE GALACTO-
OLIGOSSACARÍDEOS USANDO A β -GALACTOSIDASE DE
*KLUYVEROMYCES LACTIS***

São Carlos - SP

2020

GUILHERMINA SCHULTZ

**MODELAGEM CINÉTICA DA SÍNTESE DE GALACTO-
OLIGOSSACARÍDEOS USANDO A β -GALACTOSIDASE DE
*KLUYVEROMYCES LACTIS***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Engenharia Química da Universidade Federal
de São Carlos para a obtenção do título de
Doutora em Engenharia Química.

**Orientador: Prof. Dr. Marcelo Perencin de
Arruda Ribeiro**

**Coorientador: Prof. Dr. Roberto de Campos
Giordano**

São Carlos - SP

2020



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química

Folha de Aprovação

Defesa de Tese de Doutorado da candidata Guilhermina Schultz, realizada em 22/12/2020.

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Marcelo Perencin de Arruda Ribeiro (UFSCar)

Prof. Dr. Edson Romano Nucci (UFSJ)

Prof. Dr. Marcel Otávio Cerri (UNESP)

Prof. Dr. Felipe Fernando Furlan (UFSCar)

Prof. Dr. Thiago Faggion de Pádua (UFSCar)

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.

Aos meus pais, Reinaldo Schultz e Romilda Marques de Moura Schultz por me apoiarem, incentivarem e acreditarem em mim durante todos esses anos. E, principalmente por não medirem esforços para que eu chegasse até esta fase da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus por ter me guiado, me dado força e sabedoria em todas essas etapas da minha vida.

Ao meu marido Celestino H. S. Siaka pelo apoio, amizade, companheirismo, amor e incentivo durante todos esses anos.

Aos meus familiares, em especial meus pais Reinaldo e Romilda, meus irmãos Wesley (in memoriam), Artur e Raqueana, meus sobrinhos Bruno Otávio, Anna Mel e Enzo Rafael. Obrigada por entenderem que em diversos momentos estive ausente, muitas vezes nem se quer atendendo o celular. Mel perdoe-me por quase sempre estar ocupada escrevendo artigo e tese e não poder brincar com você nos últimos meses. Mãe, obrigada pelo apoio emocional, por se fazer presente mesmo distante, seu incentivo foi fundamental.

Ao Prof. Marcelo Perencin de Arruda Ribeiro pela orientação, ensinamentos, e contribuições que foram extremamente úteis e fundamentais para que esse trabalho fosse concluído.

Ao meu coorientador, Prof. Roberto de Campos Giordano pelo apoio, confiança e oportunidade.

Aos amigos que a UFSCar/restaurante universitário me deram em especial ao Obeedu Abubakar pela amizade sincera e verdadeira.

Aos colegas e amigos do Kyatera pela amizade, Andrew, Gustavo e outros. Em especial a Simone por sempre me ouvir e por ser uma ótima amiga.

Ao Laboratório de Desenvolvimento e Automação de Bioprocessos (LaDABio) e ao Kyatera pela infraestrutura que possibilitou o desenvolvimento desse trabalho.

À Nicole por gentilmente compartilhar seu computador comigo para que eu pudesse fazer minhas simulações.

Aos professores do departamento de química (DQ) da Universidade Federal de São Carlos Edenir Rodrigues Pereira Filho e Orlando Fatibello Filho. Ao Edenir por me ensinar e deixar que eu fizesse a caracterização dos sais do permeado usando o ICP OES em seu laboratório e ao Fatibello por tirar dúvidas relacionadas aos sais do permeado.

Aos colegas do Departamento de Engenharia Química pela amizade e troca de informação sobre experimentos e uso de equipamentos.

À Empresa de Desenvolvimento Tecnológico Ltda. (EDETTEC) pela doação da enzima β -galactosidase de *K. lactis*.

À Tangará Foods pela doação do permeado do soro de leite.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) (código financeiro 001) e à FAPESP (Processo nº 2018/04933-5) pelo apoio financeiro.

Aos funcionários e professores do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química pelos ensinamentos e assistência durante todos esses anos. A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

“Se não puder voar, corra. Se não puder correr, ande. Se não puder andar, rasteje, mas continue em frente de qualquer jeito.”

Martin Luther King

RESUMO

Galacto-oligossacarídeos (GOS) apresentam um alto valor comercial e são usados na indústria de alimentos. GOS são oligossacarídeos não digeríveis (NDO), que são considerados prebióticos. Podem ser produzidos enzimaticamente a partir de substratos ricos em lactose (soro de leite, permeado do soro de leite ou lactose) usando a enzima β -galactosidase como catalisador, por meio de uma reação controlada cineticamente caracterizada pela competição entre as reações de síntese de GOS (transgalactosilação) e hidrólise da lactose. Nesses substratos há concentrações consideráveis de cátions (Na^+ , Mg^{+2} , Ca^{+2} e K^+) que podem afetar a atividade da β -galactosidase. Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi estudar a cinética da síntese enzimática de GOS utilizando como substrato lactose e permeado do soro de leite empregando como catalisador a enzima β -galactosidase livre de *Kluyveromyces lactis* (Lactozym 3000 L HP G) que possui *status* GRAS para se chegar a modelos matemáticos que viabilizem empregar ferramentas computacionais com intenção de otimização do processo. Para atingir esse objetivo foram conduzidas diversas reações. Nos ensaios de velocidades iniciais, a maior parte dos experimentos foram realizados em 220 g/L de lactose (pura, ou presente em permeado do soro de leite) e sais de cloreto foram adicionados quando utilizada lactose pura, para verificar a influência deles sobre a velocidade inicial de síntese e hidrólise, atividade total e seletividade. Os resultados obtidos indicam que, dentro da região estudada, o sódio, dentre todos os íons testados, foi o que provocou maior seletividade. O cálcio inibiu a velocidade inicial de síntese e hidrólise da enzima. Em meios contendo potássio juntamente com sódio, o efeito de inibição pelo sódio na velocidade inicial de hidrólise foi ainda mais acentuado. Efeito parecido ocorreu, quando foi utilizado potássio e cálcio, pois a inibição causada pelo cálcio, na atividade total, velocidade inicial de síntese e hidrólise parece ser potencializado pela presença do potássio. Para o modelo cinético, os ajustes foram feitos por regressão não linear, no qual foram utilizadas diversas concentrações iniciais de lactose e enzima. O modelo apresenta nove parâmetros ajustáveis e caracteriza a formação de Glb, tri, tetrassacarídeos e a inativação enzimática. Um método de bootstrap, com base nos resíduos obtidos durante o procedimento de ajuste, é empregado para calcular os intervalos de confiança dos parâmetros. Este modelo se ajusta bem aos dados experimentais. Como resultado, este modelo pode ser útil para otimização de biorreatores e projeto de processos, bem como controle de processos.

Palavras-chave: Galactobiose. Galacto-oligossacarídeos. β -galactosidase. *Kluyveromyces lactis*. Modelagem.

ABSTRACT

Galacto-oligosaccharides (GOS) have a high commercial value and are used in the food industry. GOS are non-digestible oligosaccharides (NDO), which are considered prebiotics. They can be produced enzymatically from substrates rich in lactose (whey, whey permeate or lactose) using the enzyme β -galactosidase as a catalyst, through a kinetically controlled reaction characterized by competition between GOS synthesis reactions (transgalactosylation) and lactose hydrolysis. In these substrates there are considerable concentrations of cations (Na^+ , Mg^{+2} , Ca^{+2} and K^+) that can affect the activity of β -galactosidase. Thus, the objective of this work was to study the kinetics of the enzymatic synthesis of GOS using lactose and whey permeate as substrate, using the free enzyme β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* (Lactozym 3000 L HP G) as a catalyst, which has GRAS status, to arrive at mathematical models that allow the use of computational tools in order to optimize the process. To achieve this goal, several reactions were conducted. In the initial rate assays, most of the experiments were carried out on 220 g/L of lactose (pure, or present in whey permeate) and chloride salts were added when using pure lactose, to verify their influence on the initial rate of synthesis and hydrolysis, total activity and selectivity. The results obtained indicate that, within the studied region, sodium, among all the ions tested, was the one that caused the greatest selectivity. Calcium inhibited the initial rate of enzyme synthesis and hydrolysis. In media containing potassium together with sodium, the effect of sodium inhibition on the initial rate of hydrolysis was even more pronounced. A similar effect occurred when potassium and calcium were used, since the inhibition caused by calcium, in the total activity, initial rate of synthesis and hydrolysis seems to be potentiated by the presence of potassium. For the kinetic model, fit were made by non-linear regression, in which several initial concentrations of lactose and enzyme were used. The model has nine adjustable parameters and characterizes the formation of Glb, tri, tetrasaccharides and enzymatic inactivation. A bootstrap method, based on the residues obtained during the adjustment procedure, is employed to calculate the confidence intervals for the parameters. This model fits well with the experimental data. As a result, this model can be useful for optimization of bioreactors and process design, as well as process control.

Keywords: Galactobiose. Galacto-oligosaccharides. β -galactosidase. *Kluyveromyces lactis*. Modeling.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 2.1 - Estrutura da lactose e diferentes estruturas de GOS. (A) Composição, (B) grau de polimerização, (C) e (D) regioquímica. Gal- β (1 \rightarrow 6)-Gli = alolactose; Gal- β (1 \rightarrow 4)-Gal = 4-galactobiose; Gal- β (1 \rightarrow 6)-Gal = 6-galactobiose; Gal = galactose; Gli = glicose; Gal- β (1 \rightarrow 4)-Gli = lactose.....26
- Figura 2.2 - Estrutura simplificada da reação de hidrólise da lactose e da transgalactosilação usando β -galactosidase. AA = Açúcar acceptor de galactosil; E = enzima; Lac = lactose; Gal = galactose; Gli = glicose.30
- Figura 2.3 - Mecanismo bioquímico para a ação da β -galactosidase. HO-R = H₂O ou molécula de açúcar como: lactose, galactose.32
- Figura 2.4 - Mecanismo cinético para a ação da β -galactosidase de *Escherichia coli*. Lac = lactose; Gli = glicose; Gal = galactose; All = alolactose; Tri = trissacarídeo; E = enzima livre; $k'_{11} = k_{11} \times H_2O$39
- Figura 2.5 - Mecanismo cinético para as reações de hidrólise da lactose e de transgalactosilação usando a β -galactosidase imobilizada de *Aspergillus niger*. Glb = galactobiose; Trig = trissacarídeo; Tet = tetrassacarídeo; Pen = pentassacarídeo.....40
- Figura 2.6 - Mecanismo cinético considerando a inibição e a mutarrotação da galactose usando a β -galactosidase imobilizada de *Bacillus circulans*. β -Gal = β -galactose; α -Gal = α -galactose.41
- Figura 2.7 - Mecanismo cinético usando a β -galactosidase de *Aspergillus oryzae*, considerando a viscosidade do meio e a não distinção entre Gal e Glc. Mon = monossacarídeo (Gal + Gli).42
- Figura 2.8 - Mecanismo cinético usando a β -galactosidase de *Bacillus circulans*. EGal* = complexo enzima-galactosil inibido pela galactose; EGli = complexo enzima-galactosil inibido pela glicose.43
- Figura 2.9 - Mecanismo cinético considerando o efeito da alolactose e da água livre, utilizando a β -galactosidase de *Escherichia coli*. k_w = constante de velocidade da ligação de água e EGal.....44
- Figura 2.10 - Mecanismo cinético utilizando a β -glicosidase de *Pyrococcus furiosus*. K_{IC} = parâmetro cinético para a inibição competitiva da glicose.44
- Figura 2.11 - Mecanismo cinético utilizando a β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis*.....45
- Figura 2.12 - Mecanismo cinético utilizando duas β -galactosidas de *Kluyveromyces lactis* e *Aspergillus aculeatus*. Lu = lactulose; Fru = frutose; Tril = trissacarídeo formado pela galactose e lactulose.47
- Figura 2.13 - Mecanismo cinético utilizando a β -galactosidase de *Aspergillus oryzae*. Di = dissacarídeo que inclui lactose e galactobiose.....48

- Figura 2.14 - Mecanismo cinético utilizando a β -galactosidase imobilizada de *Bacillus circulans*. GOS = representa tri, tet e pentassacarídeo. 48
- Figura 2.15 - Mecanismo cinético utilizando a β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis*. EGalGli = complexo de inibição. 49
- Figura 2.16 - Mecanismo cinético utilizando a β -galactosidase de *Aspergillus oryzae*. 50
- Figura 3.1 - Cromatograma de amostras durante a síntese de GOS usando HPLC-RID e uma coluna SUPELCOGEL Ca⁺². Ensaio com uma concentração inicial de lactose (CIL) de 0,64 M e E= 0,5E₀. 56
- Figura 4.1 - Síntese de GOS usando tampão fosfato de potássio (50 mM, pH 7), 40 °C e concentração de *Kl*- β -Gal de 5,8 U/mL. (A) CIL = 0,64 M, (B) CIL = 0,64 M (substrato = permeado), (C) CIL = 0,64 M + 51,4 mM Na⁺, (D) CIL = 0,64 M + 12 mM Mg²⁺, (E) CIL = 0,64 M + 6,7 mM K⁺, (F) CIL = 1,17 M, (substrato = permeado). Di = Lac + Glb (■), GOS-3 = Tri + Trig (▼), GOS-4 = Tet + Tetg (◆), Gli (▲) e Gal (●). As barras de erro correspondem ao desvio padrão (d.p.) das réplicas de ensaios (2 ou 3). 59
- Figura 4.2 - Velocidades iniciais de síntese e hidrólise, atividade total da *Kl*- β -Gal (A, C, E, G e I) e seletividade (B, D, F, H e J) da reação de síntese de GOS usando concentração de enzima de 5,8 U/mL e CIL de 0,64 M. Ensaio foram realizados em tampão fosfato de potássio (50 mM, pH 7), 40 °C e 30 minutos de reação. As barras de erro correspondem ao desvio padrão (d.p.) das réplicas de ensaios (2). 62
- Figura 4.3 - Síntese de GOS usando concentração de *Kl*- β -Gal de 5,8 U/mL. Ensaio foram realizados em tampão fosfato de potássio (50 mM, pH 7) e 40 °C. (A) 5% de Gal em CIL = 0,80 M (274 g/L), (B) CIG = 0,3 M (54 g/L) (concentração inicial de galactose). Di = Lac + Glb (■), GOS-3 = Tri + Trig (▼), GOS-4 = Tet + Tetg (◆), Gli (▲), Gal (●) e Glb (●). As barras de erro correspondem ao desvio padrão (d.p.) das réplicas de ensaios (2). 69
- Figura 4.4 - Síntese de GOS usando uma concentração de *Kl*- β -Gal de 5,8 U/mL e CIL = 0,80 M (274 g/L). Ensaio foram realizados em tampão fosfato de potássio (50 mM, pH 7) e 40 °C. As barras de erro correspondem ao desvio padrão (d.p.) das réplicas de ensaios (2). 70
- Figura 4.5 - Síntese de GOS usando 5,8 U/mL de enzima e permeado do soro de leite como substrato, CIL = 0,64 M e 40 °C. Ensaio foram realizados em (A) tampão fosfato de potássio (50 mM e pH 7), (B) tampão PEM pH 6,5 de acordo com FCC V e (C) tampão PEM (50 mM e pH 7). Di = Lac + Glb (■), GOS-3 = Tri + Trig (▼), GOS-4 = Tet + Tetg (◆), Gli (▲) e Gal (●). As barras de erro correspondem ao desvio padrão (d.p.) das réplicas de ensaios (2). 71
- Figura 4.6 - Mecanismo cinético proposto para a síntese enzimática de GOS. 73
- Figura 4.7 - Pseudo balanço de resíduos de glicose e galactose (Gli/Gal)*, Equação 4.1 versus tempo. Concentração da enzima é de $2,42 \times 10^{-7}$ mol/L (E₀). (A) CIL = 0,60 M e E = E₀, (B) CIL = 0,64 M e E = 1,5E₀. As barras de erro correspondem ao desvio padrão (d.p.) das réplicas de ensaios (2 ou 3). 77

Figura 4.8 - Síntese de GOS usando a *Kl*- β -Gal. Ensaios realizados em tampão fosfato de potássio (50 mM, pH 7), 40 °C. Concentração de enzima usada foi de $2,42 \times 10^{-7}$ mol/L (E_0), exceto quando indicado de outra forma. (A) CIL = 0,30 M, (B) CIL = 0,60 M, (C) CIL = 0,64 M, (D) CIL = 0,64 M e $E = 0,5E_0$, (E) CIL = 0,64 M e $E = 1,5E_0$, (F) CIL = 0,70 M. Di = Lac + Glb (■), GOS-3 = Tri + Trig (▼), GOS-4 = Tet + Tetg (◆), Gli (▲) e Gal (●). Os símbolos representam dados experimentais e as linhas sólidas são os ajustes da curva do modelo proposto. As barras de erro correspondem ao d.p. das réplicas de ensaios (2 ou 3). ..78

Figura 4.9 - Atividade relativa em função do tempo para a *Kl*- β -Gal a 40 °C. A_t é a atividade enzimática ao longo do tempo e A_{t_0} é a atividade enzimática inicial. Os símbolos representam dados experimentais (com barras de erro correspondendo ao desvio padrão de ensaios em triplicata) e a linha sólida o modelo de primeira ordem (Equação 4.10).....79

Figura 4.10 - Conjunto dos parâmetros obtidos pela abordagem de bootstrap. \times Representa os valores da distribuição do parâmetro e \square representa os valores ótimos dos parâmetros. 80

Figura 4.11 - Separação de galacto-oligosacarídeos: (A, B e E) para CIL = 0,30 M, (C, D e F) para CIL = 0,60 M. Símbolos representam Glb (●) e Lac (■) estimado pelo balanço de Gli/Gal (em Equação 4.19) por meio de dados experimentais. As barras de erro correspondem ao d.p. de réplicas de ensaios (2 ou 3) e concentração inicial de enzima igual a E_0 . As linhas sólidas são os ajustes da curva do modelo proposto..... 82

Figura 4.12 - Validação do modelo cinético. (A) CIL = 0,90 M, (B) CIL = 1,20 M. Di = Lac + Glb (■), GOS-3 = Tri + Trig (▼), GOS-4 = Tet + Tetg (◆), Gli (▲) e Gal (●). Os símbolos representam dados experimentais (com d.p. das réplicas de ensaios (2 ou 3)) e as linhas sólidas são os ajustes da curva do modelo proposto..... 84

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 - Estruturas de diferentes oligossacarídeos obtidos a partir de β -galactosidases....	25
Tabela 2.2 - Características das β -galactosidases obtidas de diversos micro-organismos.	31
Tabela 2.3 - Efeito de cátions na atividade da <i>Kl</i> - β -Gal. (+ = ativação, – = inibição, o = sem efeito, n.d. = não determinado, +/- = efeito muda).	35
Tabela 4.1 - Composição dos sais do permeado do soro de leite.	58
Tabela 4.2 - Concentrações máximas de GOS-3, GOS-4 e galactose obtidas na Figura 4.1A-F.	60
Tabela 4.3 - ANOVA e teste de Tukey realizados nos resultados apresentados na Figura 4.2A-B.	63
Tabela 4.4 - ANOVA e teste de Tukey realizados nos resultados apresentados na Figura 4.2C-D.	64
Tabela 4.5 - ANOVA e teste de Tukey realizados nos resultados apresentados na Figura 4.2E-F.	65
Tabela 4.6 - ANOVA e teste de Tukey realizados nos resultados apresentados na Figura 4.2G-J.	66
Tabela 4.7 - ANOVA e teste de Tukey realizados nos resultados apresentados na Figura 4.2.	67
Tabela 4.8 - Concentrações máximas de GOS-3, GOS-4 e galactose obtidas na Figura 4.5A-C.	72
Tabela 4.9 - Parâmetros estimados para síntese com a <i>Kl</i> - β -Gal em pH 7 e 40 °C.	80
Tabela 4.10 - Matriz de correlação dos parâmetros estimados apresentados na Tabela 4.9.	81

LISTA DE SIGLAS

AA - Açúcar Aceptor de Galactosil
All - Alolactose
ANOVA - Analysis of Variance
BSA - Albumina de Soro Bovino
CIG - Concentração Inicial de Galactose
CIL - Concentração Inicial de Lactose
CPS - Concentrado Proteico do Soro
DBO - Demanda Bioquímica de Oxigênio
Di - Dissacarídeos que inclui lactose e galactobiose
DO - Digestible Oligosaccharides
DQO - Demanda Química de Oxigênio
E - Enzima
EDETEC - Empresa de Desenvolvimento Tecnológico Ltda.
EDTA - Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
EGal - Complexo Enzima-Galactosil
EGal* - Complexo Enzima-Galactosil inibido pela galactose
EGal-6-Gli - Complexo Enzima-Galactosil-6-Glicose
EGalGli - Complexo Enzima-Galactosil-Glicose
EGli - Complexo Enzima-Galactosil inibido pela glicose
ELac - Complexo Enzima-Lactosil
ELSD - Detector Evaporativo com Espalhamento de Luz
ELu - Complexo Enzima-Lactulose
ESI - Ionização por Electrospray
FAO - Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura
FCC - Food Chemicals Codex
FOS - Fruto-Oligossacarídeos
FOSHU - Foods for Specified Health Use
Fru - Frutose
Gal - Galactose
GC - Cromatógrafo Gasoso
Glb - Galactobiose
Gli - Glicose

GOS - Galacto-Oligossacarídeos
GRAS - Generally Recognized as Safe
HILIC - Cromatografia Líquida de Interação Hidrofílica
HMOs - Oligossacarídeos do Leite Humano
HPAEC-PAD - Cromatografia de Troca Aniônica de Alto Desempenho Acoplada à Detecção Amperométrica Pulsada
HPLC - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
ICP OES - Espectrometria de Emissão Atômica com Plasma Acoplado Indutivamente
ISAPP - International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics
IUB - União Internacional de Bioquímica
IUPAC - União Internacional de Química Pura e Aplicada
JCBN - Comissão Conjunta de Nomenclatura Bioquímica
 K_{IC} - Parâmetro cinético para a inibição competitiva da glicose
KI- β -Gal - β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis*
Lac - Lactose
LaDABio - Laboratório de Desenvolvimento e Automação de Bioprocessos
Lu - Lactulose
MALDI-TOF-MS - Ionização/Dessorção a Laser Assistida por Matriz Acoplada a Espectrometria de Massa por Tempo de Voo
Mon - Monossacarídeo
MS - Espectrometria de Massa
NDO - Non Digestible Oligosaccharides
NMR - Ressonância Magnética Nuclear
OMS - Organização Mundial de Saúde
ONP - o-nitrofenil
ONPG - o-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo
PEM - Fosfato-EDTA-Magnésio
Pen - Pentassacarídeos
PI - Índice Prebiótico
RID - Detector de Índice de Refração
SCFAs - Ácidos Graxos de Cadeia Curta
SDS - Dodecil Sulfato de Sódio
Tet - Tetrassacarídeo
Tetg - Tetrassacarídeo formado exclusivamente de galactose (Gal-Gal-Gal-Gal)

Tri - Trissacarídeo formado pela galactose e glicose (Gal-Gal-Gli)

Trig - Trissacarídeo formado exclusivamente de galactose (Gal-Gal-Gal)

Tril - Trissacarídeo formado pela galactose e lactulose (Gal-Gal-Fru)

WPC - Whey Protein Concentrate

α -Gal - α -galactose

β -Gal - β -galactose

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1 PREBIÓTICOS, PROBIÓTICOS E SIMBIÓTICOS	19
2.1.1 Prebióticos	19
2.1.2 Probióticos	20
2.1.3 Simbióticos	21
2.2 OLIGOSSACARÍDEOS	22
2.2.1 Galacto-Oligossacarídeos (GOS).....	24
2.2.1.1 Benefícios de GOS na Saúde.....	27
2.2.1.2 Produção de GOS.....	28
2.2.1.2.1 Síntese Enzimática de GOS.....	29
2.3 ENZIMA β -GALACTOSIDASE	30
2.4 SORO DE LEITE, PERMEADO DO SORO DE LEITE E LACTOSE.....	32
2.4.1 Efeitos de Íons na Atividade da β -Galactosidase.....	34
2.5 EFEITO BIFIDOGÊNICO DA GALACTOBIOSE E DA ALOLACTOSE	36
2.6 MÉTODOS DE SEPARAÇÃO DE GOS	37
2.7 MODELAGEM CINÉTICA DE SÍNTESE DE GOS	38
3 MATERIAL E MÉTODOS	52
3.1 MATERIAL.....	52
3.1.1 Enzima	52
3.1.2 Reagentes e Padrões	52
3.2 MÉTODOS	52
3.2.1 Caracterização do Permeado do Soro de Leite em Termos dos Sais Solúveis Presentes.....	52
3.2.2 Atividade Enzimática e Determinação de Proteínas	53
3.2.2.1 Estabilidade Enzimática.....	54
3.2.3 Síntese Enzimática de Galacto-Oligossacarídeos.....	54
3.2.3.1 Síntese Enzimática de GOS na Presença de Sais.....	54
3.2.3.2 Síntese Enzimática de GOS na Presença de Galactose.....	55
3.2.3.3 Síntese Enzimática de GOS na Presença de Tampão PEM.....	55
3.2.3.4 Análises em HPLC.....	55
3.2.4 Estimação de Parâmetros.....	56

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	58
4.1 CARACTERIZAÇÃO DO PERMEADO DO SORO EM RELAÇÃO AOS SAIS	58
4.1.1 Influência dos Sais na Síntese Enzimática de GOS	58
4.1.1.1 Influência de Cátions nas Velocidades Iniciais de Síntese de GOS e Hidrólise da Lactose, Seletividade e Atividade Total.....	61
4.1.2 Influência da Galactose na Síntese Enzimática de GOS	69
4.1.2.1 Velocidades Iniciais de Síntese de GOS e Hidrólise da Lactose, Seletividade e Atividade Total.....	70
4.1.3 Influência do Tampão na Síntese Enzimática de GOS	70
4.2 MODELAGEM CINÉTICA DA SÍNTESE ENZIMÁTICA DE GALACTO-OLIGOSSACARÍDEOS: DESCRREVENDO A FORMAÇÃO DE GALACTOBIOSE.....	72
4.2.1 Mecanismo de Reação e Desenvolvimento do Modelo	72
4.2.2 Modelagem Cinética	72
4.2.2.1 Formação de Galactobiose.....	76
4.2.2.2 Ajuste do Modelo Cinético para Síntese de GOS e Estimativa do Conjunto de Parâmetros.....	77
4.2.2.3 Validação de dados experimentais com resultados simulados.....	84
5 CONCLUSÕES.....	85
6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	86
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87
APÊNDICE A - ENSAIOS DE VELOCIDADES INICIAIS	101

1 INTRODUÇÃO

A Associação Científica Internacional de Probióticos e Prebióticos (ISAPP, International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics) definiu mais recentemente prebiótico como “um substrato que é utilizado seletivamente por microrganismos hospedeiros, conferindo benefício à saúde” (GIBSON *et al.*, 2017). Galacto-oligossacarídeos (GOS) se enquadram nesta definição de prebióticos e podem ser classificados como oligossacarídeos não digeríveis (NDO), que são considerados prebióticos bifidogênicos e lactogênicos (LOO *et al.*, 1999; THONGARAM *et al.*, 2017). A síntese de GOS ganhou interesse na indústria de alimentos, pois podem ser incorporados em uma ampla gama de produtos alimentícios. Além disso, apresentam *status* GRAS (Generally Recognized as Safe) nos Estados Unidos e são considerados como aditivo de alimentos FOSHU (Foods for Specified Health Use) pelo Ministério da Saúde do Japão (TORRES *et al.*, 2010; TZORTZIS; VULEVIC, 2009). Eles podem ser adicionados como suplementos às fórmulas infantis para recém-nascidos, pois podem imitar alguns efeitos prebióticos dos oligossacarídeos do leite humano (HMOs) presentes no leite materno (INTANON *et al.*, 2014; VERKHNYATSKAYA *et al.*, 2019). Entretanto, vale ressaltar que os GOS não apresentam todos os efeitos benéficos dos HMOs.

GOS apresentam diversos benefícios para a saúde, dentre esses, pode-se destacar: o consumo de GOS causa aumento no crescimento de bifidobactérias e lactobacilos e inibe o crescimento de bactérias indesejáveis (GIOVANNINI *et al.*, 2014; ROBERFROID *et al.*, 2010; SKÓRKA *et al.*, 2018; VEEREMAN-WAUTERS *et al.*, 2011), aumenta absorção de ferro (PAGANINI *et al.*, 2017) e cálcio (WHISNER *et al.*, 2013), melhora a digestão da lactose em indivíduos intolerantes (AZCARATE-PERIL *et al.*, 2017; MISSELWITZ *et al.*, 2019) e produz metabólitos que exercem papéis protetores no câncer colorretal (FONG; LI; YU, 2020).

A reação da síntese enzimática de GOS é conhecida como transgalactosilação (CRITTENDEN; PLAYNE, 1996), é realizada a partir de substratos ricos em lactose (p.ex. soro de leite, permeado do soro de leite e lactose) utilizando a enzima β -galactosidase como catalisador. Essa reação é controlada cineticamente, caracterizada pela competição entre as reações de síntese de GOS e hidrólise da lactose (TZORTZIS; VULEVIC, 2009; URRUTIA *et al.*, 2013). Os GOS tem grande importância comercial, uma vez que o preço unitário da lactose é em torno de 0,8 USD/kg, enquanto o preço de GOS é aproximadamente 5,8 USD/kg.

Sua produção apresentou uma taxa de crescimento anual de 9,3% de 2014 a 2020 (FISCHER; KLEINSCHMIDT, 2018). Além do valor comercial, produzir GOS a partir de substratos como soro e permeado do soro de leite é uma alternativa ambientalmente amigável, visto que esses substratos apresentam uma alta demanda química de oxigênio (DQO) e uma alta demanda bioquímica de oxigênio (DBO). Porém, apresentam em sua composição concentrações consideráveis de cátions (Na^+ , Mg^{+2} , Ca^{+2} e K^+) que podem influenciar a atividade da β -galactosidase (FISCHER; KLEINSCHMIDT, 2018; KAREB; AÏDER, 2019; TORRES *et al.*, 2010).

Modelos matemáticos que descrevem a síntese enzimática de GOS são importantes para encontrar as condições ótimas de operação. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi estudar a cinética da síntese enzimática de galacto-oligossacarídeos (GOS) utilizando como substrato lactose e permeado do soro de leite empregando como catalisador a enzima β -galactosidase livre de *Kluyveromyces lactis* (Lactozym 3000 L HP G), que possui *status* GRAS, para se chegar a modelos matemáticos que viabilizem empregar ferramentas computacionais com intenção de otimização do processo. Os seguintes objetivos específicos foram propostos com a finalidade de atingir o objetivo geral:

- Caracterizar o permeado do soro de leite em termos dos sais solúveis presentes (demais componentes já foram caracterizados em trabalho preliminar).
- Verificar a influência dos sais na síntese de GOS.
- Ajustar modelo cinético para a síntese de GOS a partir de ensaios em batelada para diversas concentrações iniciais de lactose e de enzima.
- Validar o modelo cinético prevendo a produção de GOS com altas concentrações de lactose.
- Validar o perfil de galactobiose previsto pelo modelo utilizando balanço de massa de resíduos de sacarídeos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 PREBIÓTICOS, PROBIÓTICOS E SIMBIÓTICOS

Nesta seção serão abordados os conceitos de prebióticos, probióticos e simbióticos.

2.1.1 Prebióticos

A definição de prebióticos sofreu muitas mudanças nos últimos vinte anos devido ao avanço nas pesquisas. A ideia de prebióticos foi introduzida e definida por Gibson e Roberfroid (1995) como “um ingrediente alimentar não digerível que afeta benéficamente o hospedeiro, estimulando seletivamente o crescimento e/ou atividade de uma ou de um número limitado de bactérias no cólon e, assim, melhora a saúde do hospedeiro”. Neste estudo, os autores limitaram os benefícios dessas substâncias a um grupo selecionado de bactérias no sistema digestivo, bifidobacterias e lactobacilos.

Em 2004, a definição de prebiótico foi atualizada como “ingredientes seletivamente fermentados que permitem alterações específicas, tanto na composição e/ou atividade da microflora gastrointestinal que conferem benefícios ao bem-estar e à saúde do hospedeiro” (GIBSON *et al.*, 2004). Foi estabelecido que para uma substância ser classificada como prebiótica, ela deve ser capaz de resistir à digestão e absorção no trato gastrointestinal do hospedeiro, pode ser fermentada pela microflora e estimular seletivamente o crescimento e/ou atividade das bactérias intestinais para promoção da saúde. Os prebióticos que respeitaram esses critérios durante o estudo foram fruto-oligossacarídeos, galacto-oligossacarídeos e lactulose, exigindo estudos futuros para descobrir outras substâncias.

Em 2010, a Associação Científica Internacional para Probióticos e Prebióticos (conhecido pela sigla em inglês ISAPP, International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics) revisou a definição de prebiótico como “um ingrediente fermentado seletivamente que resulta em mudanças específicas na composição e/ou atividade da microbiota gastrointestinal, conferindo assim benefícios à saúde do hospedeiro” (GIBSON *et al.*, 2010).

Bindels *et al.* (2015) chegaram a uma definição de prebiótico como “um composto não digerível que, por meio de sua metabolização por microrganismos no intestino, modula a composição e/ou atividade da microbiota intestinal, conferindo assim um efeito

fisiológico benéfico no hospedeiro”. Essa definição não focou na especificidade e seletividade dos microrganismos e eliminou efeitos em outras partes como a vagina e a pele.

Em 2017, o ISAPP redefiniu o conceito de prebiótico como “um substrato que é utilizado seletivamente por microrganismos hospedeiros que confere um benefício à saúde” (GIBSON *et al.*, 2017). A associação realizou uma reunião em dezembro de 2016 composta por especialistas em microbiologia, pesquisa clínica e nutrição e divulgou um documento de consenso sobre o assunto. Esta nova definição adicionou substâncias sem carboidratos, como ácidos graxos, fitoquímicos e fenólicos, como possíveis fontes de prebióticos, e expandiu a aplicação de prebióticos para outras regiões do corpo, como a vagina e a pele.

As substâncias geralmente consideradas como prebióticos são oligossacarídeos fermentáveis, fruto-oligossacarídeos (FOS), galacto-oligossacarídeos (GOS), lactulose e inulina. Exemplos de alimentos que contêm oligossacarídeos fermentáveis como GOS e FOS são trigo, cevada, centeio, cebola, alho-poró, parte branca da cebolinha, alho, chalotas, alcachofras, beterraba, erva-doce, ervilhas, chicória, pistache, castanha de caju, legumes, lentilhas, e grão de bico (SHEPHERD; LOMER; GIBSON, 2013).

2.1.2 Probióticos

Os probióticos foram definidos em 2001 em Córdoba na Argentina como “microrganismos vivos que quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefício à saúde do hospedeiro” (FAO/WHO, 2001). Essa definição foi feita após uma consulta conjunta de cientistas convocados pela Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura e da Organização Mundial de Saúde (FAO/OMS) sobre avaliação das propriedades nutricionais e de saúde de probióticos em alimentos, incluindo leite em pó com bactérias vivas de ácido láctico e contou com a presença de vários especialistas de diferentes países (HILL *et al.*, 2014).

A ideia dos probióticos se originou de Eli Metchnikoff, um cientista russo cuja observação em 1907 foi que “a dependência dos micróbios intestinais dos alimentos torna possível a adoção de medidas para modificar a microflora em nossos corpos e substituir os micróbios nocivos por micróbios úteis” (METCHNIKOFF, 1907).

Outro cientista que teve um papel fundamental nesse conceito foi Henry Tissier, que identificou uma redução significativa na quantidade de determinado tipo de bactéria em crianças com diarreia. Estas bactérias específicas (bifido) foram observadas em

maior quantidade em crianças saudáveis. Após essa observação marcante, ele propôs que esses microrganismos podem ser aplicados aos pacientes para obter uma saúde intestinal ideal, ajudando assim a resolver a diarreia (TISSIER, 1906).

A palavra “probiótico” foi cunhada e usada pela primeira vez por Lilly e Stillwell em 1965, para se referir a substâncias que eram produzidas por micro-organismos para estimular o crescimento de outros micro-organismos (LILLY; STILLWELL, 1965). Esta definição não exclui as propriedades probióticas especificamente para o intestino, mas também para outras partes do corpo, ela pode ser aplicada tanto ao homem quanto aos animais, também o probiótico pode consistir em mais do que espécies bacterianas (HOLZAPFEL *et al.*, 1998).

Para que os probióticos sejam reconhecidos por possuírem propriedades microbianas, a definição de probiótico foi revisada como “um suplemento alimentar microbiano vivo que afeta benéficamente o animal hospedeiro, melhorando seu equilíbrio intestinal” (FULLER, 1989).

Havenaar e Huis In’t Veld (1992) propuseram uma definição que é análoga à de Fuller como, “uma cultura mono ou mista viável de bactérias que, quando aplicada ao animal ou ao homem, afeta benéficamente o hospedeiro, melhorando as propriedades da microflora indígena”. A definição que se usa atualmente é “microrganismos vivos que quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefício à saúde do hospedeiro”. Bactérias probióticas que têm sido usadas na maioria dos estudos são membros das bactérias produtoras de ácido láctico, especialmente aquelas associadas ao gênero *Lactobacilos*, *Bifidobacteria*, bactérias gram-positivas não patogênicas e micro-organismos não bacterianos como certas leveduras, tal como *Saccharomyces boulardii* (GUARNER; SCHAAFSMA, 1998).

2.1.3 Simbióticos

Os simbióticos são definidos como “uma mistura de probióticos e prebióticos que afeta benéficamente o hospedeiro, melhorando a sobrevivência e implantação de suplementos alimentares microbianos vivos no trato gastrointestinal, estimulando seletivamente o crescimento e/ou ativando o metabolismo de um ou de um número limitado de bactérias promotoras da saúde, melhorando assim o bem-estar do hospedeiro” (GIBSON; ROBERFROID, 1995).

Um dos principais aspectos a ser considerados no desenvolvimento de uma fórmula simbiótica é selecionar adequadamente prebióticos e probióticos que possuam benefícios positivos à saúde do hospedeiro (MARKOWIAK; ŚLIZEWSKA, 2017). Os mais comumente usados em produtos simbióticos consistem em uma combinação de bifidobactérias ou lactobacilos com fruto-oligossacarídeos (CRITTENDEN, 2012; OLVEIRA; GONZÁLEZ-MOLERO, 2016; SÁEZ-LARA *et al.*, 2016). Na fórmula simbiótica, o componente prebiótico deve ser capaz de estimular positivamente o componente probiótico (OLVEIRA; GONZÁLEZ-MOLERO, 2016).

2.2 OLIGOSSACARÍDEOS

A União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC) e a União Internacional de Bioquímica (IUB) estabeleceram a Comissão Conjunta de Nomenclatura Bioquímica (JCBN). De acordo com essa Comissão, a terminologia abreviada para oligossacarídeos são moléculas que consistem em 2 a 10 unidades de monossacarídeos que são conectadas entre si por ligações glicosídicas e apresentam baixo peso molecular (LIEBECQ, 1998). Embora, oligossacarídeos também possam ser definidos como moléculas que contêm entre 2 e 20 unidades de monossacarídeos (ROBERFROID; SLAVIN, 2000). Os oligossacarídeos são diferenciados dos polissacarídeos por seu grau de polimerização de 10, uma regra geralmente aceita por vários órgãos (CUMMINGS *et al.*, 1997).

Os oligossacarídeos são compostos solúveis em água. Eles são compostos doces, mas essa característica depende de vários fatores, como seu grau de polimerização, a estrutura química e a quantidade de monossacarídeos e dissacarídeos na mistura (CRITTENDEN; PLAYNE, 1996; VORAGEN, 1998). Alguns oligossacarídeos possuem efeitos benéficos à saúde e como consequência disso a sua produção aumentou bastante nos últimos anos. São utilizados em bebidas, fórmulas infantis, adoçantes, medicamentos e cosméticos (LISBOA, 2008). Além disso, podem ser encontrados em produtos naturais como vegetais, mel, frutas, leite materno (MEHRA; KELLY, 2006).

Os oligossacarídeos podem ser classificados como digeríveis (DO, Digestible Oligosaccharides) ou não digeríveis (NDO, Non Digestible Oligosaccharides) com base em suas propriedades fisiológicas. Roberfroid e Slavin (2000) observaram que o átomo C anomérico C1 ou C2 exibia um mecanismo que rejeitava os efeitos hidrolíticos das enzimas digestivas humanas, surgindo assim o conceito de NDO.

Sako, Matsumoto e Tanaka (1999) caracterizaram 13 tipos diferentes de oligossacarídeos não digeríveis que são reconhecidos por suas propriedades bifidogênicas e produzidos para fins comerciais. Sendo eles: ciclodextrinas, fruto-oligossacarídeos, galacto-oligossacarídeos, gentio-oligossacarídeos, glicosilucrose, isomalto-oligossacarídeos, isomaltulose (ou palatinose), lactosacarose, lactulose, malto-oligossacarídeos, rafinose, oligossacarídeos de soja, xilo-oligossacarídeos. Quimicamente, eles são diferenciados pelo tamanho das cadeias, composição do monossacarídeo, o grau pelo qual eles se ramificam e pureza.

Oligossacarídeos não digeríveis atualmente reconhecidos e aplicados em componentes de alimentos consistem em carboidratos que contêm frutose, glicose, lactose, galactose e/ou xilose como unidade de monossacarídeo. Eles podem ser extraídos de produtos naturais ou produzidos artificialmente por meio de processos químicos pela hidrólise de polissacarídeos, ou podem ser obtidos pela síntese enzimática de dissacarídeos (MUSSATTO; MANCILHA, 2007). Os NDO são amplamente reconhecidos por seus efeitos bifidogênicos, pois promovem a proliferação de bactérias benéficas no intestino, principalmente as espécies bifidobactérias e lactobacilos (ASADPOOR *et al.*, 2020; BIELECKA *et al.*, 2002).

O trato gastrointestinal possui uma população muito ampla e complexa de bactérias, principalmente bactérias anaeróbias. Nele, cerca de 500 espécies diferentes de bactérias foram relatadas na literatura. Embora a maioria não prejudique o hospedeiro, algumas espécies desses microrganismos podem levar a problemas patológicos (ISOLAURI; SALMINEN; OUWEHAND, 2004; MANNING; GIBSON, 2004; ZIEMER; GIBSON, 1998).

Vários oligossacarídeos não sofrem digestão porque o corpo humano não possui as enzimas adequadas para a hidrólise das ligações β associadas a esses carboidratos. Esses compostos geralmente contêm glicose, galactose e/ou xilose como unidades do monossacarídeo (RIVERO-URGELL; SANTAMARIA-ORLEANS, 2001). A resistência à digestão permite que os compostos atinjam o cólon, no qual sofrem hidrólise para formar monômeros e oligômeros menores. Após esse processo, eles são metabolizados pela maioria das bactérias anaeróbias existentes para fornecer energia para sua proliferação, o que leva à produção de gases como H_2 , CO_2 , CH_4 e ácidos graxos de cadeia curta (conhecido pela sigla em inglês SCFAs) como acetato, propionato, butirato e L-lactato. Assim, os NDO podem regular processos metabólicos e indiretamente servir como fonte de energia (DELZENNE; ROBERFROID, 1994).

É bem notado que os oligossacarídeos contêm pelo menos três unidades de monossacarídeos, no entanto, a lactulose é um dissacarídeo, mas geralmente é classificada como oligossacarídeos porque exerce características semelhantes a outros oligossacarídeos (CRITTENDEN; PLAYNE, 1996). Quanto maior a cadeia de oligossacarídeos, menor a doçura. Esse efeito é importante porque os oligossacarídeos com cadeias maiores podem ser usados na produção de alimentos para substituir a sacarose, que é um dos menores oligossacarídeos com maior doçura (ROBERFROID; SLAVIN, 2000). Além disso, os oligossacarídeos podem ser usados para controlar a contaminação de micróbios porque são capazes de reter uma maior quantidade de umidade, inibir a secagem e reduzir a atividade da água (CRITTENDEN; PLAYNE, 1996).

Oligossacarídeos não digeríveis como galacto-oligossacarídeos, fruto-oligossacarídeos e lactulose contêm valor calórico estimado em 1,0-2,0 kcal/g. Esta quantidade é de aproximadamente 30-50% em comparação com oligossacarídeos digeríveis como a sacarose. O valor calórico determinado para GOS é 1,73 kcal/g (SAKO; MATSUMOTO; TANAKA, 1999).

2.2.1 Galacto-Oligossacarídeos (GOS)

GOS são compostos por uma mistura de di, tri e oligossacarídeos maiores, formados por estruturas de D-glicose- $[\beta\text{-D-galactose}]_n$ ou D-galactose- $[\beta\text{-D-galactose}]_n$ (MAHONEY, 1998; YAÑEZ-ÑECO *et al.*, 2017) com diferentes ligações glicosídicas, principalmente $\beta\text{-(1}\rightarrow\text{6)}$ e $\beta\text{-(1}\rightarrow\text{4)}$ e em menor grau $\beta\text{-(1}\rightarrow\text{3)}$ (vide Tabela 2.1). O seu grau de polimerização (n) geralmente varia de 1 a 5 unidades monoméricas (GOSLING *et al.*, 2010; MUSSATTO; MANCILHA, 2007).

Tabela 2.1 - Estruturas de diferentes oligossacarídeos obtidos a partir de β -galactosidases.

Estrutura*		Ligações glicosídicas	Nomenclatura
Dissacarídeos	D-Gal-D-Gli	β -(1 \rightarrow 6)	alolactose
		β -(1 \rightarrow 2) ou β -(1 \rightarrow 3)	2-galactosil-glicose ou 3-galactosil-glicose
	D-Gal-D-Gal	β -(1 \rightarrow 6)	6-galactobiose
		β -(1 \rightarrow 3) ou β -(1 \rightarrow 4)	3-galactobiose ou 4-galactobiose
Trissacarídeos	D-Gal-D-Gal-D-Gli	β -(1 \rightarrow 6)/ β -(1 \rightarrow 6)	6'digalactosil-glicose
		β -(1 \rightarrow 6)/ β -(1 \rightarrow 4)	6'galactosil-lactose
		β -(1 \rightarrow 4)/ β -(1 \rightarrow 4)	4'galactosil-lactose
		β -(1 \rightarrow 3)/ β -(1 \rightarrow 4)	3'galactosil-lactose
	D-Gal-D-Gal-D-Gal	β -(1 \rightarrow 6)/ β -(1 \rightarrow 6)	6'galactotriose
tetrassacarídeos	D-Gal-D-Gal-D-Gal-D-Gli	β -(1 \rightarrow 6)/ β -(1 \rightarrow 6)/ β -(1 \rightarrow 4)	6'digalactosil-lactose
		β -(1 \rightarrow 6)/ β -(1 \rightarrow 3)/ β -(1 \rightarrow 4) ou β -(1 \rightarrow 3)/ β -(1 \rightarrow 6)/ β -(1 \rightarrow 4)	
	D-Gal-D-Gal-D-Gal-D-Gal	β -(1 \rightarrow 6)/ β -(1 \rightarrow 6)/ β -(1 \rightarrow 6)	6'galactotetraose
pentassacarídeos	D-Gal-D-Gal-D-Gal-D-Gal-D-Gli	β -(1 \rightarrow 6)/ β -(1 \rightarrow 6)/ β -(1 \rightarrow 6)/ β -(1 \rightarrow 4)	6'trigalactosil-lactose

*D-Gal = resíduo de D-galactose; D-Gli = resíduo de D-glicose.

Fonte: adaptado de Mahoney (1998).

De acordo com a Figura 2.1 pode-se perceber que as estruturas de GOS podem distinguir-se a partir da composição de sacarídeos, grau de polimerização e regioquímica das ligações glicosídicas. Na Figura 2.1A estão apresentadas a alolactose [Gal- β (1 \rightarrow 6)-Gli] e a 6-galactobiose [Gal- β (1 \rightarrow 6)-Gal], ambas são formadas pela mesma ligação glicosídica β -(1 \rightarrow 6), têm o mesmo tamanho de cadeia (dissacarídeos), porém uma apresenta um terminal de glicose, enquanto a outra é composta exclusivamente por unidades de galactose. Na Figura 2.1B estão exibidos GOS com estruturas de diferentes tamanhos. Essa variedade de estruturas é de extrema importância, uma vez que diferentes estruturas de GOS geram diferentes efeitos prebióticos. O principal fator que afeta essas características apresentadas na Figura 2.1 durante a síntese enzimática de GOS é a origem da β -galactosidase (BOON; JANSSEN; VAN'T RIET, 2000; CHEN; GANZLE, 2017; FISCHER; KLEINSCHMIDT, 2018; FRENZEL *et al.*, 2015; GUERRERO *et al.*, 2011; YIN *et al.*, 2017). A concentração de GOS presente no meio reacional durante a transgalactosilação pode ser afetada pela concentração de lactose (GOSLING *et al.*, 2011; HUBER; KURZ; WALLENFELS, 1976; JENAB *et al.*, 2018). Na Figura 2.1C-D estão apresentadas duas estruturas idênticas em termos de composição de monossacarídeos, contudo ambas têm ligações glicosídicas distintas, sendo elas β -(1 \rightarrow 4) e β -(1 \rightarrow 6). As estruturas apresentadas na Figura 2.1C são a lactose [Gal-

$\beta(1\rightarrow4)$ -Gli] e a alolactose [Gal- $\beta(1\rightarrow6)$ -Gli], na Figura 2.1D são a 4-galactobiose [Gal- $\beta(1\rightarrow4)$ -Gal] e a 6-galactobiose [Gal- $\beta(1\rightarrow6)$ -Gal].

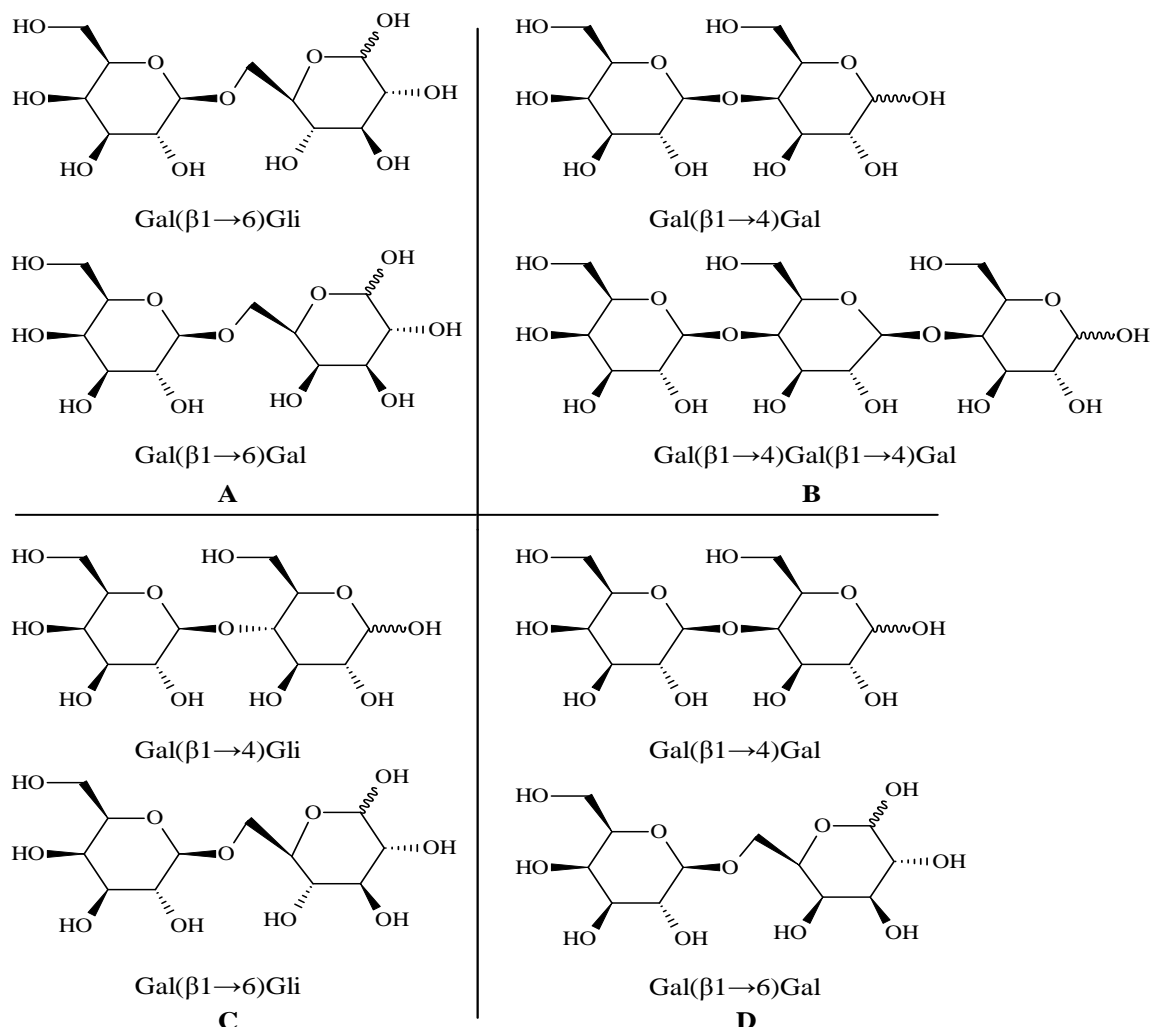


Figura 2.1 - Estrutura da lactose e diferentes estruturas de GOS. (A) Composição, (B) grau de polimerização, (C) e (D) regioquímica. Gal- $\beta(1\rightarrow6)$ -Gli = alolactose; Gal- $\beta(1\rightarrow4)$ -Gal = 4-galactobiose; Gal- $\beta(1\rightarrow6)$ -Gal = 6-galactobiose; Gal = galactose; Gli = glicose; Gal- $\beta(1\rightarrow4)$ -Gli = lactose.

Fonte: Adaptado de Gosling *et al.* (2010).

GOS podem ser incorporados em uma ampla gama de produtos alimentícios, apresentam *status* GRAS (Generally Recognized as safe) nos Estados Unidos e são considerados como aditivo de alimentos FOSHU (Foods for Specified Health Use) pelo Ministério da Saúde do Japão (TORRES *et al.*, 2010; TZORTZIS; VULEVIC, 2009), pelo fato de serem componentes presentes em leite humano e no iogurte tradicional. Podem ser produzidos por bactérias intestinais residentes por meio da ingestão da lactose. É considerado não tóxico, mas seu consumo em excesso pode provocar diarreia (OTIENO, 2010; SAKO; MATSUMOTO; TANAKA, 1999; TORRES *et al.*, 2010).

GOS e FOS são frequentemente misturados na proporção de 9:1 de GOS de cadeia curta e FOS de cadeia longa para se assemelhar à composição encontrada no leite materno humano, permitindo que sejam adicionados como suplementos a fórmulas infantis para recém-nascidos alimentados com mamadeira (BOEHM *et al.*, 2008; BRAEGGER *et al.*, 2011; HUET *et al.*, 2016; MIQDADY *et al.*, 2020). Esta mistura de oligossacarídeos é usada para imitar alguns efeitos prebióticos dos oligossacarídeos do leite humano (HMOs) presentes no leite materno (INTANON *et al.*, 2014; VERKHNYATSKAYA *et al.*, 2019), apesar de não imitar todos os benefícios dos HMOs. Isso é de grande importância, pois cerca de 70% das crianças estão sendo alimentadas com fórmulas em países desenvolvidos (VICTORA *et al.*, 2016).

Os GOS podem ser obtidos na forma líquida ou em pó, com uma mistura de diferentes espécies de oligossacarídeos (mais de 55 %), lactose (~20%), glicose (~20%) e poucas quantidades de galactose (SAKO; MATSUMOTO; TANAKA, 1999). São fabricados e comercializados em escala comercial por diversas empresas, tais como: Yakult Honsha, Friesland Foods Domo, Nissin Sugar e Clasado Ltd. (ILLANES; VERA; WILSON, 2016).

2.2.1.1 Benefícios de GOS na Saúde

Diversos estudos relataram os efeitos prebióticos positivos de GOS em bebês, adolescentes, adultos e idosos. Fórmula infantil contendo GOS levou a um aumento no crescimento de bifidobactérias e lactobacilos e inibiu o crescimento de clostridium, resultando em menor incidência de cólica (GIOVANNINI *et al.*, 2014; ROBERFROID *et al.*, 2010; SKÓRKA *et al.*, 2018; VEEREMAN-WAUTERS *et al.*, 2011). Bebês alimentados com fórmula contendo GOS apresentaram alterações na composição e consistência fecal, frequência de fezes e modificação da microbiota (BOREWICZ *et al.*, 2019; COSTALOS *et al.*, 2008; SIERRA *et al.*, 2014). Além disso, uma mistura prebiótica de GOS e FOS reduz o risco de alergias e doenças infecciosas, especialmente aquelas relacionadas ao trato respiratório superior nos primeiros seis meses de vida (ARSLANOGLU, Sertac; MORO; BOEHM, 2007), até 18 meses de idade (ARSLANOGLU *et al.*, 2012; ARSLANOGLU *et al.*, 2008).

GOS foi administrado em um estudo para controlar os sintomas do trato gastrointestinal, como inchaço, flatulência e dor abdominal em adultos (VULEVIC *et al.*, 2018). Uma mistura de GOS reduz alguns biomarcadores de inflamação das vias aéreas, sugerindo seu uso terapêutico em pacientes adultos asmáticos (WILLIAMS *et al.*, 2016). Foi

demonstrado que o consumo de GOS aumentou a absorção de ferro nos bebês recrutados (PAGANINI *et al.*, 2017). Além disso, também tem sido utilizado para regular o apetite em crianças obesas e com sobrepeso (HUME; NICOLUCCI; REIMER, 2017) e para aumentar a absorção de cálcio em adolescentes (WHISNER *et al.*, 2013). Ademais, a microbiota e o sistema imunológico de idosos saudáveis melhoraram com a ingestão de GOS (VULEVIC *et al.*, 2008, 2015).

Prebióticos como GOS melhoram a digestão da lactose em indivíduos com intolerância à lactose (AZCARATE-PERIL *et al.*, 2017; MISSELWITZ *et al.*, 2019). O consumo de GOS produz ácidos graxos de cadeia curta (SCFAs) no cólon, incluindo acetato, propionato e butirato. Esses metabólitos, especialmente o butirato, exercem papéis protetores no câncer colorretal (FONG; LI; YU, 2020). Além disso, esses SCFAs são metabolizados pelo epitélio colônico (butirato), fígado (propionato) e músculo (acetato) (CUMMINGS; MACFARLANE, 1997; RODRIGUEZ-COLINAS *et al.*, 2013). Devido a esses efeitos benéficos para a saúde, os GOS são muito atrativos para a indústria de alimentos e com alto valor comercial (5,8 USD/kg) (FISCHER; KLEINSCHMIDT, 2018) e com uma expectativa de lucro de cerca de 10,55 bilhões USD no mercado global até 2025 (LU *et al.*, 2020; MANO *et al.*, 2018).

2.2.1.2 Produção de GOS

GOS podem ser produzidos de diferentes maneiras, tais como síntese química, fermentação ou enzimática. A síntese química é realizada a partir dos monossacarídeos pela hidrólise ácida da lactose (HUH; TOBA; ADACHI, 1991). Essa reação é complexa, pois os monossacarídeos contêm diversos grupos hidroxila com reatividade similar, possibilitando a formação de uma mistura complexa de sacarídeos com uma variedade de ligações com configurações anoméricas α e β , sendo que somente as configurações β são desejáveis por conferir condição prebiótica. Assim, esse processo não é utilizado em grande escala, pois gera produtos com baixa especificidade (compostos altamente ramificados), devido às condições extremas empregadas durante essa reação (BARRETEAU; DELATTRE; MICHAUD, 2006; ILLANES; VERA; WILSON, 2016; TORRES *et al.*, 2010).

A fermentação parece ser um processo rentável para a síntese de GOS visto que não há a necessidade de isolar a enzima a partir da célula produtora. E, além disso, durante o crescimento celular, glicose e galactose podem ser consumidas, aliviando a inibição por produto de algumas β -galactosidas durante a formação de GOS. Contudo, sua

desvantagem é a produção simultânea de metabólitos durante a fermentação, como glicerol e etanol, que podem afetar o sabor e outras características do produto final, e a presença de nutrientes residuais no meio utilizado. Além do mais, faz-se necessário manter o processo em condições estéreis para que não haja contaminação no sistema e o produto de interesse seja de fato acumulado (GOSLING *et al.*, 2010; LEE; KIM; OH, 2004; TORRES *et al.*, 2010). Em contrapartida, as principais vantagens da síntese enzimática de GOS é sua regioespecificidade e estereoespecificidade (BUCKE, 1996; CROUT; VIC, 1998).

2.2.1.2.1 Síntese Enzimática de GOS

A síntese enzimática de GOS utiliza como catalisador a enzima β -galactosidase e é realizada a partir de substratos ricos em lactose em uma reação controlada cineticamente conhecida como transgalactosilação (CRITTENDEN; PLAYNE, 1996), que se caracteriza pela competição entre as reações de síntese de GOS e hidrólise de lactose (TZORTZIS; VULEVIC, 2009; URRUTIA *et al.*, 2013). A alta concentração inicial de lactose é o principal fator que influencia a prevalência da transgalactosilação sobre a hidrólise (GOSLING *et al.*, 2011; HUBER; KURZ; WALLENFELS, 1976; JENAB *et al.*, 2018).

No mecanismo bioquímico apresentado na Figura 2.2 está representado um esquema simplificado da síntese enzimática de GOS. Nesta figura pode-se perceber que a reação de transgalactosilação é uma reação intermediária que ocorre durante a reação de hidrólise da lactose. Nesse mecanismo a enzima (E) reage com a lactose (Lac), formando o complexo enzima-lactosil (ELac), depois a glicose (Gli) é liberada e ocorre a formação do complexo enzima-galactosil (EGal). Se esse complexo reagir com uma molécula de água, ocorre a reação de hidrólise e galactose é formada. Se o complexo EGal reagir com um açúcar acceptor de galactosil (AA) que pode ser uma glicose, uma galactose, um dissacarídeo como lactose, galactobiose e alolactose, etc ocorre a reação de transgalactosilação e GOS é formado. O tamanho da cadeia e o tipo de ligação glicosídico formado depende como dito anteriormente, da origem da β -galactosidase. Oligossacarídeos de cadeia curta são preferíveis aos de cadeia longa para aditivos alimentares comerciais, pois são metabolizados mais facilmente pelas bifidobactérias, sendo rapidamente transformados em ácidos graxos de cadeia curta (MANUCCI, 2009).

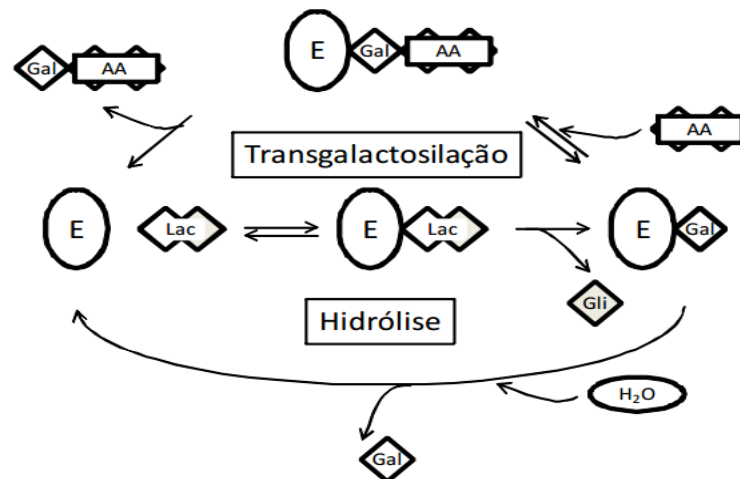


Figura 2.2 - Estrutura simplificada da reação de hidrólise da lactose e da transgalactosilação usando β -galactosidase. AA = Açúcar aceitador de galactosil; E = enzima; Lac = lactose; Gal = galactose; Gli = glicose.

Fonte: Adaptado de Manucci (2009).

Diversas enzimas podem ser empregadas para a síntese enzimática de GOS, sendo elas glicosiltransferases (EC 2.4) ou glicosil hidrolases (EC 3.2.1). As glicosiltransferases são mais eficientes, regioseletivas e estereosseletivas que as glicosil hidrolases. Contudo, essas enzimas não são utilizadas para fins comerciais na produção de GOS por causa da sua indisponibilidade, preço elevado e a necessidade de doadores de glicosil específicos como substratos. Embora as glicosil hidrolases sejam menos estereosseletivas, atualmente elas são as mais utilizadas para a produção industrial de GOS devido à sua disponibilidade e ao preço acessível (TORRES *et al.*, 2010; TZORTZIS; VULEVIC, 2009).

2.3 ENZIMA β -GALACTOSIDASE

A β -galactosidase (β -D-galactosideo galactohidrolase, EC 3.2.1.23) é uma enzima classificada como glicosil hidrolase produzida por vários organismos, incluindo plantas (sementes de soja, alfafa, café, amêndoas, pêssegos, damascos, maçãs), órgãos de animais (coelhos, bezerros, ovelhas, cabras, rato, cérebro, placenta e testículos de cães), e micro-organismos (LU *et al.*, 2020), tais como leveduras: *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces fragilis* e *Candida pseudotropicalis*, fungos: *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus flavus*, e culturas de bactérias: *Bacillus circulans*, *Escherichia coli*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus coagulans*, *Thermus aquaticus* (NIVETHA; MOHANASRINIVASAN, 2017). As propriedades catalíticas de algumas dessas enzimas estão indicadas na Tabela 2.2. Nela estão apresentados parâmetros característicos de cada

enzima, esses parâmetros diferem entre si e isso ocorre por causa do tipo de microrganismo e também das condições de reação utilizadas (OTIENO, 2010).

Tabela 2.2 - Características das β -galactosidases obtidas de diversos micro-organismos.

Fonte	pH ótimo	T Ótima (°C)	Ativador	Inibidor	K _M (mM) lactose	Peso Molecular (kDa)	Referência
<i>Kluyveromyces lactis</i>	6,5	37	Mg ²⁺ , K ⁺	Ca ²⁺ , Na ⁺ , Zn ²⁺ , Cu ²⁺	35	119	(CAVILLE; COMBES, 1995)
<i>Kluyveromyces fragilis</i>	6,6	30	-	SDS	0,23-0,99 (ONPG)	200	(JURADO <i>et al.</i> , 2004)
<i>Aspergillus niger</i>	3,5	58	-	-	85	124	(AEHLE, 2004; OTIENO, 2010)
<i>Aspergillus oryzae</i>	5,0	55	-	-	50	90	(AEHLE, 2004; OTIENO, 2010)
<i>Escherichia coli</i>	7,2	40	K ⁺ , Na ⁺	-	2	540	(AEHLE, 2004; OTIENO, 2010)
<i>Bacillus circulans</i>	6,0	65	-	-	41,7	67	(NAKANISHI <i>et al.</i> , 1983)

- = não necessita de ativador ou inibidor; SDS = dodecil sulfato de sódio; ONPG = o-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo.

As β -galactosidases que podem ser utilizadas em produtos alimentícios e farmacêuticos não necessitando de purificação extensa são as que apresentam *status* GRAS, sendo elas de origem fúngica: *A. oryzae* e *A. niger*, de leveduras como: *K. lactis* e *K. fragilis*, e de bactérias como: *Bacillus circulans* (RICO-DIAZ *et al.*, 2017). Não é aconselhável o uso em processos alimentícios e farmacêuticos da β -galactosidase de *Escherichia coli* por apresentarem riscos de toxicidade associados aos extratos brutos de coliformes, ou seja, não apresentam *status* GRAS (GEKAS; LOPEZ-LEIVA, 1985).

A enzima β -galactosidase é utilizada na indústria para hidrolisar a ligação $\beta(1\rightarrow4)$ da lactose presente nos produtos lácteos, originando seus monômeros, β -D-galactose e D-glicose, pois cerca de 68% da população mundial apresentam malabsorção deste dissacarídeo (STORHAUG; FOSSE; FADNES, 2017). Além disso, essa enzima pode ser utilizada para produzir GOS, um produto de alto valor agregado a partir de substratos ricos em lactose. Essa reação está apresentada na Figura 2.3, na qual a reação de hidrólise é predominante em meios com baixa concentração de lactose, entretanto, em meios com alta concentração de substrato (lactose), ocorre uma maior disponibilidade de aceptores de galactosil e conseqüentemente a atividade da água diminui. Dessa forma, ocorre a prevalência da reação de transgalactosilação (síntese de GOS) sobre a hidrólise (GOSLING *et al.*, 2010). No mecanismo bioquímico da Figura 2.3 também estão apresentados os dois resíduos de ácido glutâmico (Glu482 e Glu551), neste caso, presentes no sítio ativo da enzima β -

galactosidase de *K. lactis* que servem como doador de prótons e como nucleófilo/base na reação enzimática (KIM; JI; OH, 2003; PRENOSIL; STUKER; BOURNE, 1987).

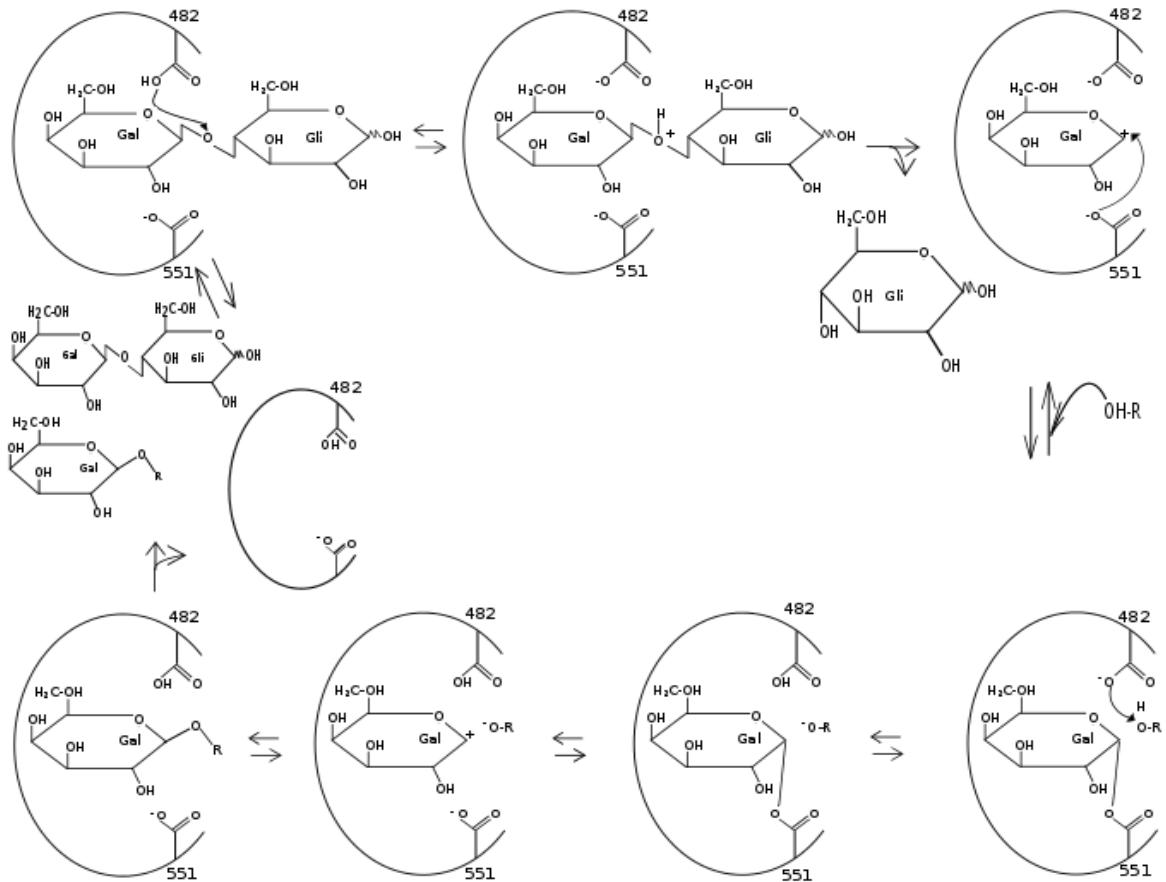


Figura 2.3 - Mecanismo bioquímico para a ação da β -galactosidase. HO-R = H₂O ou molécula de açúcar como: lactose, galactose.

Fonte: Adaptado de MANUCCI (2009).

2.4 SORO DE LEITE, PERMEADO DO SORO DE LEITE E LACTOSE

Soro de leite é o principal subproduto adquirido por meio da produção do queijo (KREWINKEL *et al.*, 2014). É uma porção líquida amarelo-esverdeada obtida após a formação da coalhada/produtos coagulados que resultam de ácido ou enzima proteolítica (GONZÁLEZ SISO, 1996). Sendo que, essa coloração obtida é resultante da presença de vitamina B12 (riboflavina) (WIT, 2001).

O soro contém entre 45% a 50% do sólido total do leite, 20% da proteína do leite, 70% do açúcar do leite (lactose), 70% a 90% dos minerais do leite e quase todas as vitaminas solúveis em água encontradas no leite. Essa proteína encontrada no soro engloba aproximadamente 50% de β -lactoglobulina, 25% de α -lactalbumina e 25% de outras proteínas. O soro contém muitos nutrientes como fósforo, cálcio e aminoácidos essenciais.

Todos esses componentes tornam o soro de leite um produto altamente nutritivo (DEVI; SINGH; CHANDRA, 2017; IRKIN, 2019).

Existem dois tipos do soro de leite decorrentes da utilização de enzimas ou ácidos no processo de coagulação da caseína. São o soro doce que tem pH entre 6 a 7 e soro ácido com pH menor do que 5. O soro ácido possui uma grande quantidade de cálcio e é produzido por meio da fermentação ou ao acréscimo de ácidos minerais, como ácido clorídrico ou sulfúrico ou de ácidos orgânicos, como os ácidos cítrico, acético ou láctico. O soro doce é o subproduto da produção da maioria dos queijos, e é obtido através das enzimas proteolíticas, por exemplo, quimosina, possui uma baixa quantidade de cálcio, menor teor de cinzas, e contém maior proporção de proteína do que o soro ácido. Dessa forma, o soro ácido não é muito utilizado na indústria alimentícia devido ao seu gosto acidificado (GONZÁLEZ SISO, 1996; ROCHA-MENDOZA *et al.*, 2021; WONG; LACROIX; MCDONOUGH, 1978; YANG, 2007).

O soro de leite é produzido em grande quantidade, no qual representa 85 a 95% do volume de leite utilizado na produção de queijo, o que gera cerca de 165 milhões de toneladas por ano. Devido ao seu alto conteúdo de lactose pode gerar problemas ambientais graves se descartado de forma incorreta na natureza. Ele possui uma alta demanda bioquímica de oxigênio (DBO) de cerca de 30000 a 35000 ppm e uma alta demanda química de oxigênio (DQO) de cerca de 60000 a 80000 ppm (FISCHER; KLEINSCHMIDT, 2018; GONZÁLEZ SISO, 1996).

Antigamente o soro de leite era considerado como um subproduto indesejado e que necessitava ser tratado nas indústrias. Contudo, atualmente não é mais considerado indesejado. Por causa de considerações ambientais e econômicas, faz-se necessário sua reutilização, pois em sua composição há principalmente lactose e proteínas (KAREB; AÏDER, 2019; TORRES *et al.*, 2010). Dessa maneira, o soro de leite pode ser utilizado em formulações de bebidas lácteas fermentadas, queijos, iogurte, cremes, fertilizantes e para alimentar animais (ABREU, 1999; SILVA; BOLINI; ANTUNES, 2004).

Além disso, outra forma de reutilizar o soro é passando-o por um processo de ultrafiltração através de uma membrana, que serve para concentrar e separar fisicamente as proteínas e gorduras da lactose e minerais. Com as proteínas e gorduras retidas na membrana forma-se o concentrado proteico do soro (CPS, também conhecido pela sigla em inglês WPC, whey protein concentrate) utilizado industrialmente como suplemento de proteína e aditivo

alimentar. Enquanto, o retentado é rico em proteínas e gorduras, a lactose, minerais e alguns componentes do soro com baixo peso molecular (pequenas quantidades de lipídeos e proteínas) atravessam a membrana formando o permeado do soro de leite. Esse permeado pode ser seco e utilizado para a produção de soro em pó para a fabricação de lactose refinada e alimentação de suínos (GOLOWCZYC *et al.*, 2013; NESSMITH *et al.*, 1997). Mas, como o permeado tem alto conteúdo de lactose, ele também pode ser utilizado para produzir GOS (CORDOVA *et al.*, 2016; VERA *et al.*, 2012), ácido láctico, ácido etílico e vários outros produtos (CUI *et al.*, 2012).

A lactose é o principal componente obtido industrialmente a partir do soro de leite ou do permeado. Ela é um dissacarídeo que contém uma molécula de galactose e uma de glicose que são unidas por ligação glicosídica $\beta(1\rightarrow4)$. Sua solubilidade é baixa em comparação com outros dissacarídeos, limitando sua aplicação em produtos alimentícios (LADERO; SANTOS; GARCIA-OCHOA, 2000).

2.4.1 Efeitos de Íons na Atividade da β -Galactosidase

Atualmente uma das principais maneiras de se produzir β -galactosidase comercial é a partir da levedura *Kluyveromyces lactis* (YOU *et al.*, 2017). A β -galactosidase de *K. lactis* (*Kl*- β -Gal) é uma das enzimas mais importantes da indústria de laticínios (RICO-DIAZ *et al.*, 2017) e bastante utilizada na indústria alimentícia devido ao seu *status* GRAS (SPOHNER *et al.*, 2016), característica essa que não é comum em todas as β -galactosidasas.

A *Kl*- β -Gal pode ser utilizada para produzir GOS a partir de substratos ricos em lactose, tais como soro do leite, permeado do soro do leite e lactose. A lactose proveniente do permeado do soro de leite pode ser uma alternativa ambientalmente amigável comparada ao seu descarte por pequenos laticínios. Contudo, a purificação da lactose a partir do permeado para a síntese de GOS aumenta seu custo de produção, o que justifica o estudo do uso direto do permeado na síntese. Porém, em substratos como soro e permeado do soro de leite existem em sua composição concentrações consideráveis de cátions (Na^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} e K^+) que podem afetar de forma positiva ou negativa a atividade da enzima *Kl*- β -Gal (FISCHER; KLEINSCHMIDT, 2015; LIEPINS; CIPROVICA; ZOLNERE, 2017; MOZAFFAR; NAKANISHI; MATSUNO, 1985; VOGET *et al.*, 1994). Na Tabela 2.3 estão apresentados alguns efeitos reportados na literatura por esses íons na atividade da *Kl*- β -Gal.

Tabela 2.3 - Efeito de cátions na atividade da *KI-β-Gal*. (+ = ativação, - = inibição, o = sem efeito, n.d. = não determinado, +/- = efeito muda).

Substrato	Condição	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Na ⁺	K ⁺	Referências
lactose	tampão fosfato de potássio 20 mM (pH 7,5 e 37 °C)	n.d.	+	n.d.	+/-	(KIM, S.; LIM; KIM, 1997)
	tampão fosfato 20 mM e MnCl ₂ 0,2 mM (pH 6,6 e 37 °C)	n.d.	n.d.	-	+	(FLORES; ERTOLA; VOGET, 1996)
	tampão de ácido cítrico-fosfato de potássio 25 mM (pH 6,6)	-	+	-	+	(MOZAFFAR; NAKANISHI; MATSUNO, 1985)
ONPG	tampão fosfato de potássio 200 mM, EDTA 0,1 mM e MgCl ₂ 0,1 mM (pH 6,5 e 37 °C)	n.d.	+	n.d.	+/-	(KIM, S.; LIM; KIM, 1997)
	tampão Bis-Tris/HCl 50 mM e MgCl ₂ 1 mM (pH 6,5 e 45 °C)	o	+	+	+	(FISCHER; KLEINSCHMIDT, 2015)

Kim, S., Lim e Kim (1997) utilizaram Mg²⁺ e K⁺ e verificaram sua influência na atividade de hidrólise da lactose e do ONPG (Tabela 2.3). Ao utilizar uma concentração de 0 até 200 μmol de Mg²⁺/g de solução de enzima, a atividade de hidrólise da lactose foi continuamente aumentada, resultando em um aumento de 35%. Todavia, um aumento maior na concentração de Mg²⁺ (entre 200 e 300 μmol/g de enzima) levou a um decréscimo dessa atividade. Para a atividade de hidrólise do ONPG, a adição de Mg²⁺ provocou um aumento constante na atividade ao longo da faixa de concentrações de metal testada (0 a 400 μmol/g de enzima), obtendo um aumento de 29% na concentração máxima de Mg²⁺ (400 μmol/g de enzima). Ao utilizar K⁺ na forma de fosfato de potássio e variar sua concentração de 0 a 200 mM, a atividade de hidrólise da lactose e do ONPG aumentou até um certo nível e depois diminuiu. A atividade de hidrólise da lactose e do ONPG foi máxima em 40 mM e 80 mM de fosfato, respectivamente. Seguindo essa mesma ordem, essa atividade foi 4,3 e 1,8 vezes maior em comparação com a maior concentração de fosfato (200 mM) utilizada nos ensaios.

Flores, Ertola e Voget (1996) fizeram experimentos de hidrólise da lactose utilizando K⁺ ou Na⁺ ou ainda a combinação desses dois cátions, variando a concentração de ambos. Os autores mantiveram fixa a concentração de K⁺ em 80 mM e modificaram a concentração de Na⁺ de 40 para 80 mM. Nessas condições, observaram uma redução na atividade de hidrólise de 33%. Ao manter novamente fixo K⁺ em 40 mM e variar a concentração de Na⁺ de 20 para 40 mM, também observou-se uma redução na atividade de hidrólise de 40%. Assim, pode-se perceber que dentro da faixa estudada, a inibição da atividade de hidrólise causada pela presença do Na⁺ é ainda mais acentuada quando K⁺ também está em solução. Ao manter fixa a concentração de Na⁺ em 40 mM e aumentar a concentração de potássio de 40 para 80 mM ocorreu um aumento na atividade de hidrólise de

55 %. Dessa forma, fica evidente que o potássio funciona como um ativador na hidrólise da lactose.

Mozaffar, Nakanishi e Matsuno (1985) notaram que ao usar a lactose como substrato e aumentar a concentração de Na^+ e Ca^{2+} respectivamente de 0 mM até 100 mM e de 0 mM até 5 mM, relataram uma diminuição da atividade da *Kl*- β -Gal (65% e 32%). Já a adição de K^+ (0 mM até 100 mM) e Mg^{2+} (0 mM até 10 mM) não reduziu a atividade da enzima. Nas concentrações de 50 mM e 75 mM de K^+ a atividade foi aumentada em 105%. E, na concentração de 2 mM de Mg^{2+} a atividade aumentou em 110%. Contudo, Fischer e Kleinschmidt (2015) utilizaram a mesma enzima e como substrato o ONPG, variando a concentração dos cátions de 0 mM até 100 mM, constataram que o Ca^{2+} não afetou a atividade da enzima, o Mg^{2+} mostrou um efeito de ativação moderado. Entretanto, uma forte ativação foi causada por Na^+ e K^+ . Essas diferenças estão relacionadas com o tipo de substrato usado no ensaio (FLORES; ERTOLA; VOGET, 1996). Por exemplo, a *Kl*- β -Gal é ativada por cátions monovalentes, como K^+ e Na^+ . Com ONPG, as taxas máximas de hidrólise são obtidas com K^+ ou Na^+ , ao passo que ao usar Na^+ e lactose como substrato a enzima apresentou menor atividade de hidrólise (VOGET *et al.*, 1994). Neste trabalho foi descrito somente a influência desses cátions sobre a atividade da enzima *Kl*- β -Gal, porque esse efeito dos cátions se modifica dependendo da fonte da enzima.

2.5 EFEITO BIFIDOGÊNICO DA GALACTOBIOSE E DA ALOLACTOSE

A galactobiose tem efeito bifidogênico (RODRIGUEZ-COLINAS *et al.*, 2013; SANZ; GIBSON; RASTALL, 2005). Um estudo foi conduzido para determinar o índice prebiótico (conhecido pela sigla em inglês PI) de alguns dissacarídeos, e foi observado que a galactobiose tem um valor de PI de 10,70 que é maior do que o valor de 7,64 para os FOS (SANZ; GIBSON; RASTALL, 2005). O valor de PI expressa uma relação entre o crescimento de bactérias fecais probióticas, tais como bifidobactérias e lactobacilos, e bactérias patogênicas, tais como bacteroides e clostrídios (PALFRAMAN; GIBSON; RASTALL, 2003). O valor de PI mais alto indica que a fonte de carbono (por exemplo, galactobiose) está sendo fermentada seletivamente por microrganismos benéficos e em menor grau por bactérias indesejáveis (SANZ; GIBSON; RASTALL, 2005; VERA *et al.*, 2016).

Em ensaios de fermentação foram utilizados os trissacarídeos 4'galactosil-lactose [Gal- β (1 \rightarrow 4)-Gal- β (1 \rightarrow 4)-Gli] e 6'galactosil-lactose [Gal- β (1 \rightarrow 6)-Gal- β (1 \rightarrow 4)-Gli] e uma mistura de dissacarídeos (6'galactobiose [Gal- β (1 \rightarrow 6)-Gal] e alolactose [Gal- β (1 \rightarrow 6)-

Gli]) (RODRIGUEZ-COLINAS *et al.*, 2013). A mistura de dissacarídeos com ligações $\beta(1\rightarrow6)$ exibiu propriedades bifidogênicas semelhantes ao trissacarídeo 6'galactosil-lactose (PI = 11,66), e esta mistura apresentou um valor de PI maior do que o trissacarídeo 4'galactosil-lactose (PI = 6,39) (LI *et al.*, 2015; RODRIGUEZ-COLINAS *et al.*, 2013). Além disso, a fermentação da mistura de dissacarídeos produziu mais acetato do que os trissacarídeos, e esta produção está relacionada ao aumento da população de bifidobactérias (MACFARLANE; STEED; MACFARLANE, 2008).

Tem sido relatado que os principais produtos obtidos a partir da enzima *Kl*- β -Gal são os dissacarídeos alolactose [Gal- $\beta(1\rightarrow6)$ -Gli] e 6'galactobiose [Gal- $\beta(1\rightarrow6)$ -Gal] e o trissacarídeo 6'galactosil-lactose [Gal- $\beta(1\rightarrow6)$ -Gal- $\beta(1\rightarrow4)$ -Gli] (FRENZEL *et al.*, 2015; MARTÍNEZ-VILLALUENGA *et al.*, 2008; RODRIGUEZ-COLINAS *et al.*, 2011, 2013, 2014; YIN *et al.*, 2017), corroborando a especificidade desta enzima para formar ligações preferencialmente $\beta(1\rightarrow6)$. É bem conhecido que esses tipos de ligações são mais recalcitrantes do que GOS com ligações $\beta(1\rightarrow4)$ para degradação e hidrólise ao longo de sua passagem através do trato gastrointestinal humano superior e podem ter impedimento estérico limitado que facilita sua absorção pelas β -galactosidases sintetizadas por bactérias probióticas no intestino (LI *et al.*, 2015; YAÑEZ-ÑECO *et al.*, 2017).

2.6 MÉTODOS DE SEPARAÇÃO DE GOS

Vários métodos e técnicas são viáveis para a análise e identificação de diferentes compostos de GOS. Ocasionalmente, uma combinação de técnicas analíticas é realizada para atingir o objetivo desejado, como cromatografia líquida de interação hidrofílica (HILIC) e cromatógrafo gasoso (GC), geralmente acoplado a espectrometria de massa (MS) (CARDELLE-COBAS *et al.*, 2009; HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ *et al.*, 2012), cromatografia de troca aniônica de alto desempenho acoplada à detecção amperométrica pulsada (HPAEC-PAD) (BÖGER *et al.*, 2019; RODRIGUEZ-COLINAS *et al.*, 2013, 2014, 2016; YAÑEZ-ÑECO *et al.*, 2017; ZHU *et al.*, 2018) e/ou com espectrometria de massa (MS) (COULIER *et al.*, 2009; FRENZEL *et al.*, 2015) seguido por ressonância magnética nuclear (NMR) para confirmar o peso molecular e a estrutura química dos carboidratos (FÜREDER *et al.*, 2020; MARTINEZ-VILLALUENGA *et al.*, 2008). MS com uma fonte de ionização por electrospray (ESI) e espectroscopia de NMR também podem ser usados para purificação e caracterização de GOS (LI *et al.*, 2015).

Um dos métodos mais amplamente usados para separar dissacarídeos (p.ex. lactose, galactobiose e alolactose) é HPAEC-PAD seguido por ionização/dessorção a laser assistida por matriz acoplada à espectrometria de massa por tempo de voo (MALDI-TOF MS, do inglês matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry), e NMR para caracterização ou identificação estrutural (YIN *et al.*, 2017). Em alguns casos, após o HPAEC-PAD, uma etapa de purificação de GOS por HILIC semi-preparativa foi realizada antes de utilizar MALDI-TOF MS e NMR (RODRIGUEZ-COLINAS *et al.*, 2011; URRUTIA *et al.*, 2013). Além dessas técnicas, a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) acoplada a detectores como o índice de refração (RI) (FISCHER; KLEINSCHMIDT, 2015) ou detector evaporativo com espalhamento de luz (ELSD) pode ser empregado (HUANG *et al.*, 2020; SCHUSTER-WOLFF-BÜHRING; MICHEL; HINRICHS, 2011). Embora HPLC seja o método mais simples e menos caro, a separação de lactose e galactobiose é muito difícil usando múltiplas colunas. Isso se torna ainda mais desafiador no início da reação e utilizando uma única coluna quando o meio possui alta concentração de lactose, porque ocorre a sobreposição dos picos de lactose e galactobiose.

2.7 MODELAGEM CINÉTICA DE SÍNTESE DE GOS

O mecanismo de síntese de GOS é complexo. Essa complexidade acontece por causa das reações simultâneas de hidrólise e de transgalactosilação da lactose. Compreender mecanismos de reação é importante porque permite desenvolver modelos cinéticos para otimizar a produção de GOS através da melhor escolha para a configuração do reator e das condições de reação (GOSLING *et al.*, 2010). Dessa forma, diversos autores propuseram modelos cinéticos para explicar a síntese de GOS (MARTINS; LISBÔA, 2015; BAKKEN; HILL; AMUNDSON, 1992; BETSCHART, 1983; BOON; JANSSEN; VAN DER PADT, 1999; BRUINS *et al.*, 2003; CHEN; OU-YANG; YEH, 2003; HUBER; KURZ; WALLENFELS, 1976; IWASAKI; NAKAJIMA; NAKAO, 1996; JENAB *et al.*, 2018; KIM; JI; OH, 2004; PALAI; BHATTACHARYA, 2013; RODRIGUEZ-FERNANDEZ *et al.*, 2011; VERA *et al.*, 2011). Esses modelos geralmente são derivados de mecanismos de reação e são formados por um conjunto de equações diferenciais não lineares, dependendo do modelo do reator.

Huber, Kurz e Wallenfels (1976) propuseram um mecanismo cinético para a síntese de GOS utilizando a enzima β -galactosidase de *Escherichia coli*, usando lactose como substrato e temperatura de 30 °C (vide Figura 2.4). Esse mecanismo foi proposto para

descrever velocidades iniciais sem a adição de glicose ao meio reacional, pois os autores levantam a possibilidade que o passo no qual ocorre sua formação (k_5) poderia ser reversível. No mecanismo da Figura 2.4 foi considerado que a enzima (E) reage com o substrato (Lac), formando o complexo enzima-lactosil (ELac), posteriormente ocorre a formação do complexo enzima-galactosil-glicose (EGalGli), em seguida o complexo enzima-galactosil (EGal) é formado e a glicose (Gli) é liberada. Contudo, em uma parte do complexo enzima-galactosil-glicose (EGalGli) pode ocorrer a troca de posição da ligação glicosídica $\beta(1\rightarrow4)$ pela ligação $\beta(1\rightarrow6)$, formando o complexo enzima-galactosil-6-glicose (EGal-6-Gli) que foi usado para a formação da alolactose (All). Posteriormente, o complexo enzima-galactosil pode reagir com água ou lactose, liberando a enzima e a galactose (Gal) para o meio reacional e ocorre a formação de trissacarídeo (Tri). Vale a pena ressaltar que os autores consideraram que a alolactose é formada somente pela troca de posição da ligação glicosídica do complexo enzima-galactosil-glicose (transgalactosilação direta). Porém, mais recentemente, foi mostrado que a alolactose pode ser formada em quantidades consideráveis usando glicose como o aceptor e a partir da hidrólise do trissacarídeo (YIN *et al.*, 2017).

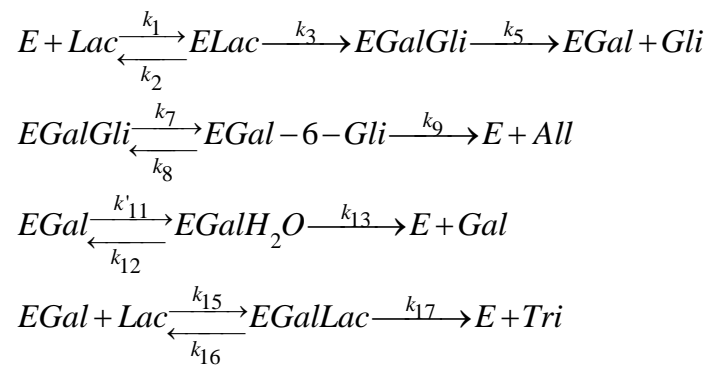


Figura 2.4 - Mecanismo cinético para a ação da β -galactosidase de *Escherichia coli*. Lac = lactose; Gli = glicose; Gal = galactose; All = alolactose; Tri = trissacarídeo; E = enzima livre; $k'_{11} = k_{11} \times H_2O$.

Fonte: Reproduzido de Huber, Kurz e Wallenfels (1976).

Betschart (1983) propôs um mecanismo cinético para a síntese de GOS e a hidrólise da lactose (Figura 2.5). Como todas as reações são assumidas como reversíveis, o mecanismo supõe que: a lactose pode ser formada a partir do complexo enzima-galactosil (EGal) mais glicose; galactose livre pode se ligar à enzima e formar o complexo EGal; galactobiose, alolactose, trissacarídeo, tetrassacarídeo e pentassacarídeo são formados usando galactose, glicose, lactose, alolactose, galactobiose, trissacarídeo e tetrassacarídeo como aceptores. Uma observação importante desse mecanismo é que tanto a alolactose quanto a lactose são usadas para formar o mesmo trissacarídeo e que galactobiose também é usada, porém para formar um trissacarídeo diferente, com moléculas exclusivas de galactose.

Possivelmente, esse mecanismo é o mais completo existente na literatura, o autor diferenciou GOS formado exclusivamente de galactose daqueles com terminação de glicose. Além disso, esse mecanismo não depende da fonte da enzima. Contudo, foi proposto somente o mecanismo cinético de reação, não foi feita a modelagem cinética.

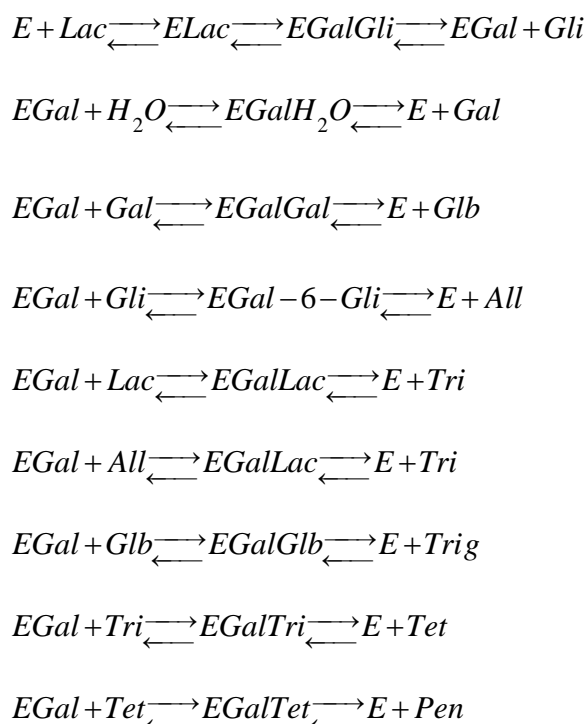


Figura 2.5 - Mecanismo cinético para as reações de hidrólise da lactose e de transgalactosilação usando a β -galactosidase imobilizada de *Aspergillus niger*. Glb = galactobiose; Trig = trissacarídeo; Tet = tetrassacarídeo; Pen = pentassacarídeo.

Fonte: Reproduzido de Betschart (1983).

Bakken, Hill e Amundson (1992) propuseram um mecanismo cinético utilizando a β -galactosidase imobilizada de *Bacillus circulans*, utilizou como substrato leite desnatado e quatro temperaturas diferentes (20 °C, 30 °C, 40 °C e 50 °C) (Figura 2.6). Nesse mecanismo foi considerada a inibição e a mutarrotação da galactose (molécula de açúcar alterna entre os anômeros alfa (α) e beta (β) de galactose), a hidrólise da lactose, a formação da galactobiose (Glb) e do trissacarídeo (Tri). Eles consideraram somente a produção de dois tipos de GOS, o Glb e trissacarídeo por causa do substrato utilizado, pois sabe-se que a concentração inicial de lactose em leite é de apenas 5% (TORRES *et al.*, 2010). Esse modelo tem 16 parâmetros e se ajustou bem aos dados experimentais. Porém, como os autores utilizaram cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), uma coluna Sugar-Pak (coluna de troca iônica à base de cálcio) e o detector de índice de refração (RID), não ocorreu separação clara dos picos de lactose e dos picos de galactobiose, então foi assumido que ambas as

concentrações foram somadas e consideradas como um único dissacarídeo, dessa forma, esta suposição foi incorporada no modelo matemático.

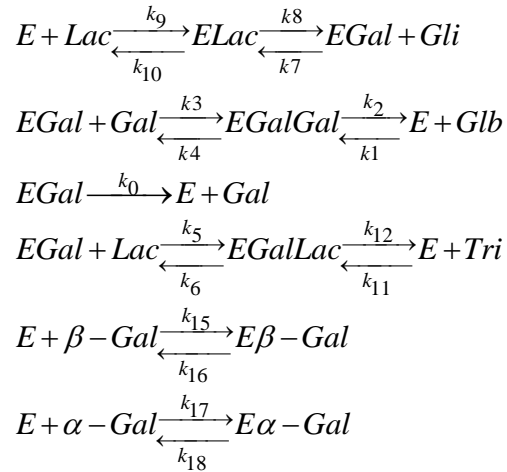


Figura 2.6 - Mecanismo cinético considerando a inibição e a mutarrotação da galactose usando a β -galactosidase imobilizada de *Bacillus circulans*. β -Gal = β -galactose; α -Gal = α -galactose.

Fonte: Reproduzido de Bakken, Hill e Amundson (1992).

Iwasaki, Nakajima e Nakao (1996) propuseram um mecanismo cinético a partir da β -galactosidase de *Aspergillus oryzae*, utilizaram lactose como substrato, a reação foi conduzida em pH 4,5 e 40 °C (Figura 2.7). Nesse modelo foi considerada a viscosidade do meio e não foi feita a distinção entre os monossacarídeos galactose e glicose, incluindo-os em um único componente, denominado monossacarídeo (Mon). A hidrólise de tetrassacarídeo e a produção de pentassacarídeo ou oligossacarídeos maiores não foram incluídas. As reações de hidrólise e transferase da lactose foram inibidas pela interação entre a enzima e o monossacarídeo produzido na reação. O modelo tem 14 parâmetros e se ajustou aos dados experimentais.

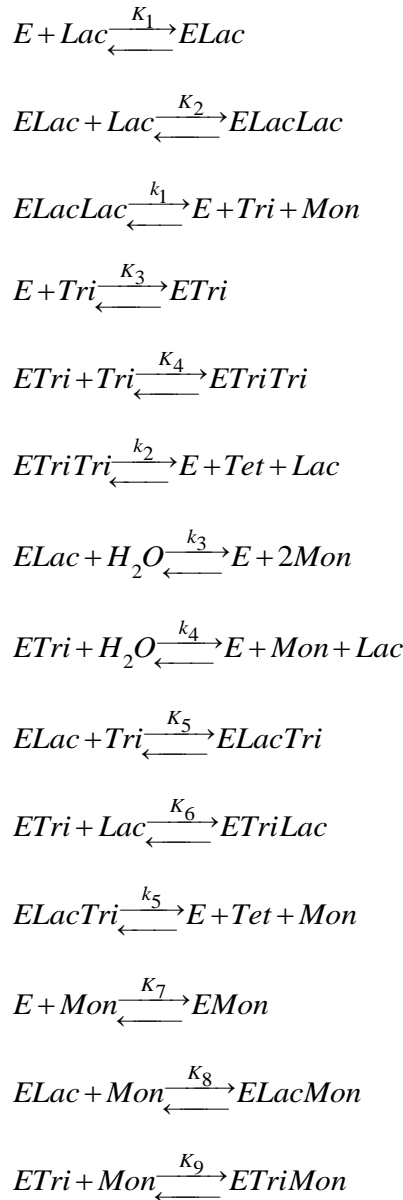


Figura 2.7 - Mecanismo cinético usando o β -galactosidase de *Aspergillus oryzae*, considerando a viscosidade do meio e a não distinção entre Gal e Glc. Mon = monossacarídeo (Gal + Gli).

Fonte: Reproduzido de Iwasaki, Nakajima e Nakao (1996).

Boon, Janssen e Van Der Padt (1999) propuseram um mecanismo cinético a partir da β -galactosidase de *Bacillus circulans*, a reação foi conduzida em pH 5 e 40 °C e foi utilizada lactose como substrato (Figura 2.8). Esse modelo apresenta apenas 6 parâmetros, porém nele foi considerada a formação de apenas um tipo de GOS, o trissacarídeo (Gal-Gal-Gli), tornando o mecanismo específico para determinada enzima. Além disso, apesar do mecanismo cinético considerar a inibição pela galactose, ela não foi modelada (k_7 e k_8 iguais à zero), ou seja, foi negligenciado, porque nas condições dos experimentos a inibição pela galactose foi menor do que a inibição pela glicose. Dessa forma, foi modelada somente a

inibição pela glicose, que foi considerada como competitiva, significando que ela se liga ao sítio ativo da enzima livre para formar o complexo inativo (EGli).

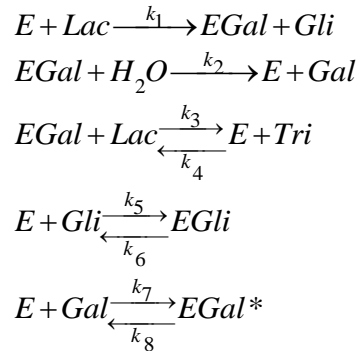


Figura 2.8 - Mecanismo cinético usando a β -galactosidase de *Bacillus circulans*. EGal* = complexo enzima-galactosil inibido pela galactose; EGli = complexo enzima-galactosil inibido pela glicose.

Fonte: Reproduzido de Boon, Janssen e Van Der Padt (1999).

Chen, Ou-Yang e Yeh (2003) propuseram um mecanismo cinético que considerou o efeito da alolactose e das moléculas de água utilizando micelas reversas a partir da β -galactosidase de *Escherichia coli* em pH 8,2, 37 °C e razão molar total de água ($W_o = 19,32$) em lactose (Figura 2.9). Nesse modelo foi assumido que a alolactose foi formada utilizando glicose como aceptor e por meio da hidrólise do trissacarídeo. A probabilidade do complexo enzima-galactosil de combinar-se com lactose ou alolactose para formar o trissacarídeo foi assumida a mesma. Também foi considerada a hidrólise da lactose e formação e hidrólise do tetrassacarídeo. Esse modelo de transgalactosilação que envolve água livre em micelas reversas tem 10 parâmetros e exibe boa correlação com dados experimentais. Nesse trabalho a alolactose foi purificada e verificada por análise de ressonância magnética nuclear de carbono-13 (RMN de ^{13}C).

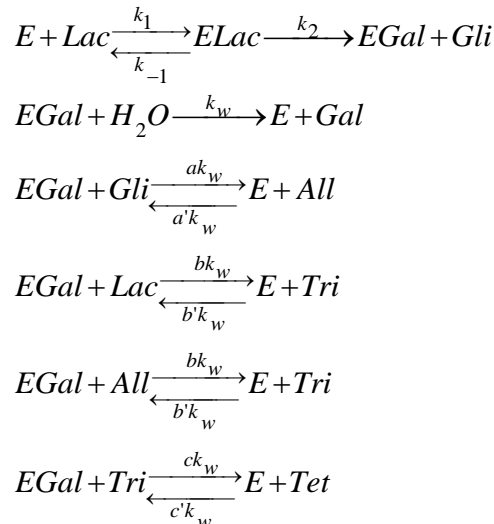


Figura 2.9 - Mecanismo cinético considerando o efeito da alolactose e da água livre, utilizando a β -galactosidase de *Escherichia coli*. k_w = constante de velocidade da ligação de água e EGal.

Fonte: Reproduzido de Chen, Ou-Yang e Yeh (2003).

Bruins *et al.* (2003) propuseram um mecanismo cinético a partir de β -glicosidase de *Pyrococcus furiosus* em 80 °C, pH 5 e lactose foi usada como substrato (vide Figura 2.10). Nesse modelo foi considerada a inibição competitiva pela glicose e GOS foi definido somente como trissacarídeo. O modelo apresenta 5 parâmetros, porém fornece um bom ajuste somente para o consumo de lactose e a formação de glicose, mas para a formação de galactose o modelo não se ajustou bem e para o trissacarídeo o modelo não concordou bem com os dados experimentais a partir de 20 h de reação.

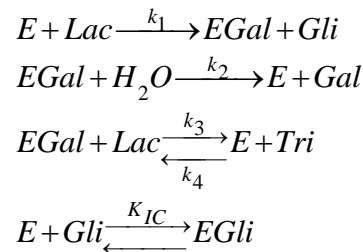


Figura 2.10 - Mecanismo cinético utilizando a β -glicosidase de *Pyrococcus furiosus*. K_{IC} = parâmetro cinético para a inibição competitiva da glicose.

Fonte: Reproduzido de Bruins *et al.* (2003).

Kim, Ji e Oh (2004) propuseram um mecanismo cinético utilizando a β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* e lactose como substrato em pH 7 e 37 °C (vide Figura 2.11). Nesse trabalho experimentos foram feitos e foi verificado que a galactose age como um inibidor em concentrações iniciais de lactose abaixo de 50 mM, nas concentrações acima de 100 mM o efeito inibitório começou a extinguir-se e ainda, a atividade foi elevada pela galactose em concentrações iniciais de lactose acima de 200 mM. Visto que foram utilizadas diversas concentrações iniciais de lactose e todas elas foram acima de 150 mM, portanto, a inibição pela galactose não foi incluída no modelo cinético. Esse modelo tem 9 parâmetros e se ajustou bem aos dados experimentais das reações ao longo do tempo. Na formação de alolactose (All) e de trissacarídeo (Tri) foram usadas glicose e lactose como aceptores.

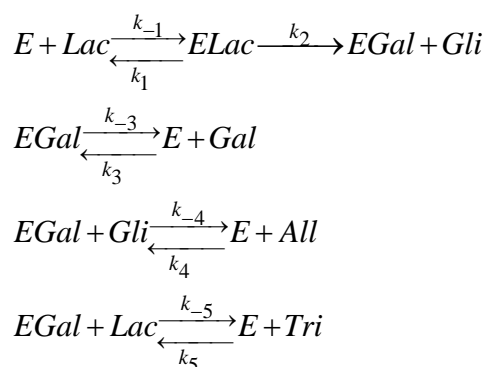


Figura 2.11 - Mecanismo cinético utilizando a β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis*.

Fonte: Reproduzido de Kim, Ji e Oh (2004).

Rodriguez-Fernandez *et al.* (2011) desenvolveram um trabalho no qual foram utilizados três diferentes concentrações de lactulose (0,73, 1,33 e 1,93 M) como substrato e duas β -galactosidases de *Kluyveromyces lactis* a 50 °C e *Aspergillus aculeatus* a 60 °C como catalisadores, ambas em pH 6,5. Todavia, também foi feita a variação de temperatura, sendo 40 °C, 50 °C e 60 °C para a β -galactosidase de *Aspergillus aculeatus* em 1,93 M de lactulose e de 40 °C e 50 °C para a *Kluyveromyces lactis* usando 0,73 M de lactulose. No mecanismo da Figura 2.12 foi considerada a hidrólise da lactulose, liberando para o meio reacional, a frutose (Fru) e a galactose (Gal), também ocorre a formação da galactobiose (Glb) e do trissacarídeo (Tril). A composição desses carboidratos foi determinada por cromatografia de troca aniônica de alto desempenho acoplada à detecção amperométrica pulsada (HPAEC-PAD).

No mecanismo, também foi considerada a inibição pela galactose (EGal*). Contudo, apesar de ter inibição no mecanismo cinético, esse passo não foi incorporado no modelo cinético. Além disso, neste trabalho não foi utilizada a hipótese de pseudo estado-estacionário para a concentração dos complexos enzimáticos intermediários que é a abordagem que grande parte dos autores utiliza na literatura (BAKKEN; HILL; AMUNDSON, 1992; CHEN; OU-YANG; YEH, 2003; JENAB *et al.*, 2018; VERA *et al.*, 2011). Ao assumir essa hipótese houve deficiência nos ajustes, em particular para a previsão das concentrações de frutose e galactose. Os autores observaram que o complexo enzima-lactulose (ELu) foi formado em pequenas quantidades quando comparado com o complexo enzima-galactosil (EGal). Dessa forma, embora o ELu tenha sido considerado no mecanismo de reação, foi desprezado no modelo cinético. Ou seja, foi removido do modelo juntamente com os parâmetros que representam sua hidrólise e formação, parâmetros k_{-1} e k_2 . Em consequência disso, esse modelo apresentou 7 parâmetros cinéticos mais a concentração

inicial de enzima. Como foram utilizadas duas β -galactosidases, diferentes concentrações iniciais de lactulose e de temperatura, nem sempre o modelo conseguiu se ajustar bem aos dados experimentais.

Ao utilizar a β -galactosidase de *A. aculeatus* em 60 °C nas concentrações de 0,73 e 1,93 M de lactulose, o modelo proposto conseguiu prever de forma satisfatória o consumo de lactulose (Lu), a formação de galactose (Gal) e de galactobiose (Glb), porém não se ajustou bem à frutose (Fru) e ao trissacarídeo (Tril). Quando foi utilizado 1,33 M de lactulose inicialmente, o modelo conseguiu se ajustar de forma satisfatória a todos os componentes do meio reacional ao longo do tempo. Ao utilizar a *Kl*- β -Gal em 50 °C e 1,93 M de lactulose o modelo concordou com todos os dados experimentais, contudo ao usar a concentração de 1,33 M de lactulose o modelo se ajustou bem a todos os dados experimentais, exceto a galactobiose. Ao usar 0,73 M de lactulose o modelo não conseguiu prever de forma satisfatória nenhum dos componentes reacionais, exceto o trissacarídeo. Quando utilizada a β -galactosidase de *A. aculeatus* em 1,93 M de lactulose e 40 °C, o modelo se ajustou bem à frutose e ao trissacarídeo, se ajustou de forma razoável à galactose e à galactobiose e não conseguiu prever bem a lactulose. Quando a reação foi conduzida sob 50 °C, o modelo se ajustou bem à lactulose, à frutose e à galactose, mas não se ajustou de forma satisfatória ao trissacarídeo e à galactobiose. Ao usar 60 °C houve um bom ajuste dos componentes, exceto a frutose. Quando utilizada a *Kl*- β -Gal em 0,73M de lactulose e 40 °C o ajuste foi satisfatório para a galactobiose e o trissacarídeo, contudo não houve um bom ajuste para a lactulose e um ajuste razoável para a frutose e a galactose. Em 50 °C houve um ajuste razoável para a galactobiose e um pobre ajuste para os demais componentes, exceto para o trissacarídeo. Os resultados foram satisfatórios para algumas condições e para outras não, porque nesse trabalho foram utilizadas diferentes temperaturas nos ensaios experimentais, entretanto, foi feito um único ajuste dos parâmetros cinéticos para cada uma das β -galactosidases.

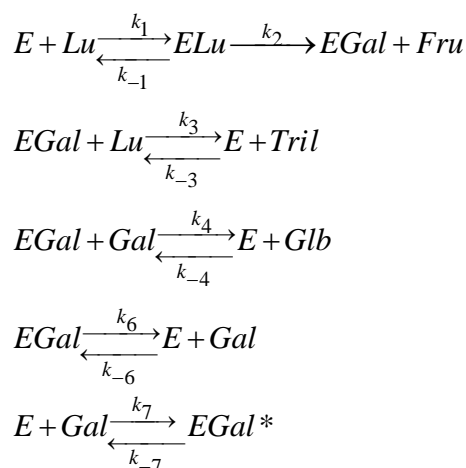


Figura 2.12 - Mecanismo cinético utilizando duas β -galactosidasas de *Kluyveromyces lactis* e *Aspergillus aculeatus*. Lu = lactulose; Fru = frutose; Tril = trissacarídeo formado pela galactose e lactulose.

Fonte: Reproduzido de Rodriguez-Fernandez *et al.* (2011).

Vera *et al.* (2011) fizeram um estudo no qual foi utilizada a β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* em pH 4,5, concentração inicial de lactose de 400 g/L e três temperaturas diferentes (40 °C, 47,5 °C e 55 °C). No mecanismo cinético da Figura 2.13, foi considerada a formação de complexos intermediários, de dissacarídeos (galactobiose), juntamente com tri até pentassacarídeo. Esses componentes foram analisados e quantificados utilizando HPLC acoplado ao RID. Também foi considerado no mecanismo cinético que a enzima sofre inibição competitiva pela galactose. O efeito da glicose na cinética da reação foi desprezado, a galactose liberada para o meio reacional pode ser descrita como uma reação de primeira ordem em relação ao complexo enzima-galactosil, a enzima não é capaz de diferenciar galactobiose (Glb) de lactose (Lac), portanto no dissacarídeo (Di) apresentado na Figura 2.13 foram incluídas ambas, lactose e galactobiose. Assim sendo, o modelo apresentou 18 parâmetros inicialmente. Com o objetivo de diminuir o número de parâmetros foi atribuído que a afinidade da enzima livre pelos diferentes substratos era similar. Também foi feita suposição análoga para o complexo enzima-galactosil e seus substratos. Isto significa que foi empregada apenas uma constante de desorção para a enzima livre e uma para o complexo enzimático. Desse modo, o número de parâmetros a ser ajustado foi reduzido para oito, sendo dois deles determinados experimentalmente e os outros seis estimados através de ajuste do modelo aos dados experimentais. Os resultados mostraram que o modelo foi capaz de se ajustar aos dados experimentais, porém o mecanismo proposto leva a uma discrepância no balanço de massa de glicose. Isso ocorre porque o modelo assume que a galactobiose (formada por duas moléculas de galactose) e a lactose (galactose mais glicose) são o mesmo dissacarídeo, que libera glicose ao ser hidrolisado, o que é claramente uma inconsistência.

Mais importante ainda, o modelo não fornece informações sobre as concentrações de galactobiose no meio de reação.

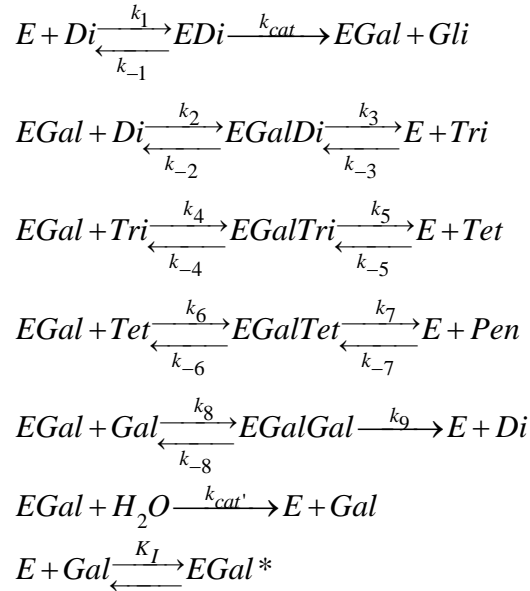


Figura 2.13 - Mecanismo cinético utilizando a β -galactosidase de *Aspergillus oryzae*. Di = dissacarídeo que inclui lactose e galactobiose.

Fonte: Reproduzido de Vera *et al.* (2011).

Palai e Bhattacharya (2013) propuseram um mecanismo cinético a partir da β -galactosidase imobilizada de *Bacillus circulans* em pH 6, 40 °C e lactose foi usado como substrato. O mecanismo apresentado na Figura 2.14 leva em consideração a hidrólise da lactose, a inibição pela glicose e a formação de GOS. É importante destacar que nesse GOS está inserido tri, tet e pentasacarídeo. A separação e a quantificação desses componentes foram feitas por HPLC e RID. O modelo mostrou boa concordância com dados experimentais e tem 11 parâmetros.

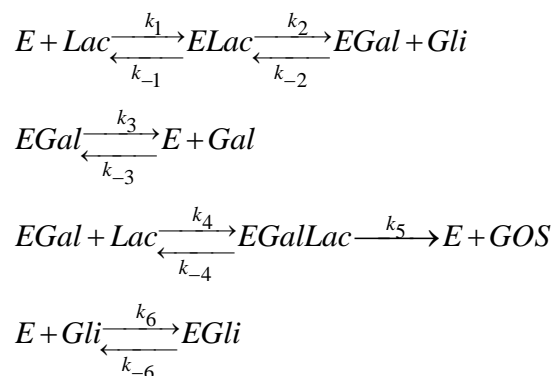


Figura 2.14 - Mecanismo cinético utilizando a β -galactosidase imobilizada de *Bacillus circulans*. GOS = representa tri, tet e pentasacarídeo.

Fonte: Reproduzido de Palai e Bhattacharya (2013).

Martins e Lisbôa (2015) desenvolveram um trabalho no qual foi utilizada lactose, a reação foi conduzida em 30 °C usando a β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis*. No mecanismo apresentado na Figura 2.15 foram considerados dois tipos de inibição, sendo elas: galactose compete com a glicose pelo sítio ativo da enzima (inibição competitiva), glicose também pode provocar a inibição do complexo enzima-galactosil (EGal) (inibição não competitiva). Além disso, o mecanismo considera que a galactobiose e a lactose podem atacar o complexo EGal para formar o mesmo trissacarídeo (Tri). O modelo tem 15 parâmetros e se ajustou aos dados experimentais. Contudo, nesse modelo há uma inconsistência no balanço de massa, porque foi considerado que o trissacarídeo formado a partir de galactose (Gal-Gal-Gal) é o mesmo formado a partir de lactose (Gal-Gal-Gli). Além disso, o modelo não traz nenhuma informação da quantidade de galactobiose e trissacarídeo no meio reacional, uma vez que ambos os componentes foram unidos e apresentados no trabalho como GOS.

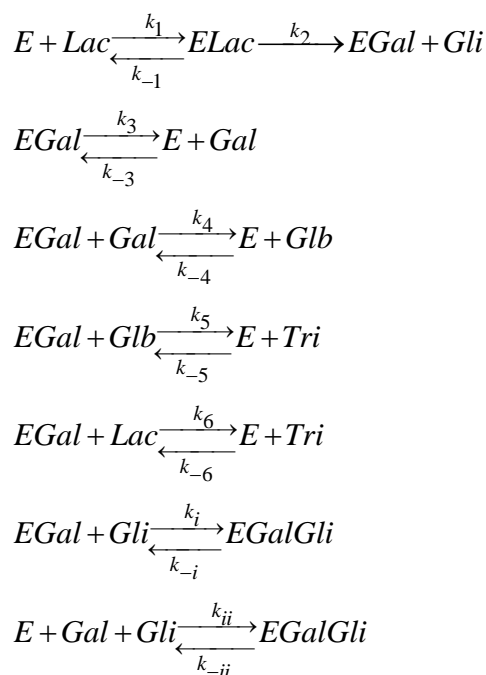


Figura 2.15 - Mecanismo cinético utilizando a β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis*. EGalGli = complexo de inibição.

Fonte: Reproduzido de Martins e Lisbôa (2015).

Jenab *et al.* (2018) fizeram um trabalho no qual foi variado a concentração inicial de enzima (0,02, 0,05 e 0,1% m/v) e de lactose (5, 10, 20, 30 e 40% m/v), o pH (4,5, 6,5 e 8) e a temperatura (40 °C, 45 °C, 50 °C, 55 °C e 60 °C). No mecanismo cinético apresentado na Figura 2.16 foi considerado que galactose age como inibidor da enzima, água

e lactose podem atacar o complexo enzima-galactosil para liberar a galactose para o meio reacional e formar o trissacarídeo. A inibição pela glicose foi negligenciada. A formação e a hidrólise de GOS maiores do que trissacarídeo não foram considerados. Dessa forma, qualquer outra quantidade de GOS maiores obtido foi incorporado no trissacarídeo e denominado como GOS. Também foi incorporada à lactose, GOS menores como galactobiose e alolactose. Essas considerações foram feitas para não aumentar o número de parâmetros estimados, ou seja, para não tornar o modelo mais complexo. Assim, o modelo tem cinco parâmetros e concordou com os dados experimentais.

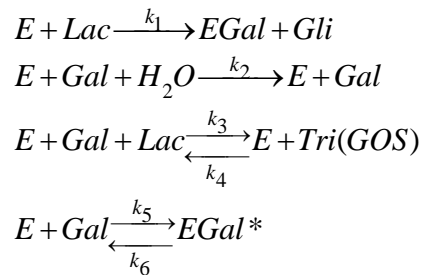


Figura 2.16 - Mecanismo cinético utilizando a β -galactosidase de *Aspergillus oryzae*.

Fonte: Reproduzido de Jenab *et al.* (2018).

De todos os modelos cinéticos apresentados neste item, somente quatro deles utilizaram galactobiose (Glb) em sua modelagem cinética (MARTINS; LISBÔA, 2015; BAKKEN; HILL; AMUNDSON, 1992; BETSCHART, 1983; RODRIGUEZ-FERNANDEZ *et al.*, 2011; VERA *et al.*, 2011). O modelo mais completo é o proposto por Betschart (1983), contudo não foi feita a modelagem desse mecanismo. Bakken, Hill e Amundson (1992), e Vera *et al.* (2011) não conseguiram separar galactobiose e lactose devido ao método utilizado nas análises (HPLC-RID). Então, consideraram Lac e Glb como um único dissacarídeo, gerando uma inconsistência no balanço de massa de glicose/galactose. Ademais, os modelos desses autores, não previram as concentrações de galactobiose na reação. Martins e Lisbôa (2015) cometeram a mesma inconsistência no balanço de massa, porém, com o trissacarídeo, considerando Gal-Gal-Gal e Gal-Gal-Gli iguais. Além disso, esse modelo não fornece informações sobre os conteúdos de galactobiose e trissacarídeo no meio reacional, pois todos esses componentes foram considerados como GOS no modelo matemático. Todavia, Rodriguez-Fernandez *et al.* (2011) pelo que se sabe até o presente momento, foi o único trabalho que conseguiu fornecer informações da concentração de Glb durante a reação. Mas, diferentemente dos trabalhos citados anteriormente, os autores utilizaram ao invés da lactose, a lactulose como substrato, caracterizando o sistema com HPAEC-PAD. Em geral, a literatura

existente parece não ter um modelo abrangente que caracterize com sucesso a formação da galactobiose quando a lactose é usada como substrato.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Nesta seção estão apresentados o material e métodos utilizados para o desenvolvimento deste trabalho.

3.1 MATERIAL

3.1.1 Enzima

A β -galactosidase (β -D-galactosideo galactohidrolase, EC 3.2.1.23) comercial líquida de *Kluyveromyces lactis* (Lactozym 3000 L HP G, Novozymes, Dinamarca) foi doada pela Empresa de Desenvolvimento Tecnológico Ltda. (EDETEC, Belo Horizonte, MG, BR) e estocada sob refrigeração.

3.1.2 Reagentes e Padrões

Neste trabalho foram utilizados como substrato lactose mono-hidratada obtida da Synth (Diadema, SP, BR) e permeado do soro de leite seco doado pela Tangará Foods (Belo Horizonte, MG, BR). Também, foi usado o substrato sintético o-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo (ONPG) obtido da Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA). Os padrões 6 β -galactosil-glicose (alolactose) e 6' β -galactosil-lactose foram obtidos da Carbosynth (Berkshire, UK). 3 β -Galactobiose, 3 α -4 β -galactotriose e 3 α -4 β -3 α -galactotetraose foram adquiridos da Dextra (Berkshire,UK). Glicose e galactose foram obtidas da Synth (Diadema, SP, BR). Os demais reagentes são todos de grau analítico.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Caracterização do Permeado do Soro de Leite em Termos dos Sais Solúveis Presentes

Espectrometria de emissão atômica com plasma acoplado indutivamente (ICP OES - iCAP 6000, Thermo Scientific, USA) foi utilizada para caracterização dos sais presentes no permeado do soro de leite. A análise foi feita no departamento de química da Universidade Federal de São Carlos.

Antes do permeado do soro ser analisado pela ICP OES foi feito um procedimento para retirar a lactose presente, para evitar sua interferência na análise. Então pesou-se 0,5 g de amostra (permeado) e transferiu-a para cadinhos. Em uma mufla, esses cadinhos com amostras e em branco (sem amostras) foram aquecidos aumentando a

temperatura gradativamente por duas horas até 900 °C. No dia seguinte após a calcinação, a mufla foi aberta e os cadinhos foram transferidos para um dessecador. Posteriormente, as cinzas foram colocadas em um balão volumétrico de 50 mL com 1 M de HNO₃. O experimento foi realizado em triplicata.

3.2.2 Atividade Enzimática e Determinação de Proteínas

A atividade da β-galactosidase da levedura mesofílica *K. lactis* foi realizada em triplicata usando uma cubeta de plástico, de 1 cm de caminho óptico em espectrofotômetro Genesys 10S (Thermo Scientific, USA) acoplado a um acessório (Air-Colled Peltier) responsável por controlar a temperatura e agitação da amostra, e um software VISIONlite (KIM; JI; OH, 2004). O ensaio foi conduzido utilizando o substrato artificial o-nitrofenil-β-D-galactopiranosídeo (ONPG). Em uma cubeta foi adicionado 2 mL de solução 2 mM de ONPG em 50 mM de tampão fosfato de potássio a pH 7, contendo 10 mM NaCl e 1,5 mM de MgCl₂ em temperatura de 40 °C. A absorbância foi medida em 410 nm nos primeiros 5 minutos de reação, de forma a estabelecer inclinação da região linear. A absorvidade molar do produto o-nitrofenil (ONP) utilizado foi de 1385 M⁻¹ cm⁻¹. Lactozym 3000 L HP G apresentou uma atividade de (663,3 ± 1,36) × 10⁴ U/L. Uma unidade da atividade da enzima (U) foi definida como a quantidade de enzima que produz 1 μmol de ONP por minuto nas condições definidas. A atividade foi calculada de acordo com a Equação 3.1.

$$At \text{ (U / mL)} = \frac{tg \times V_{reator}}{1,385 \times V_{enzima}} \quad (3.1)$$

Em que:

At = atividade hidrolítica do ONPG;

tg = tangente da curva de hidrólise;

V_{reator} (mL) = volume total do reator;

V_{enzima} (mL) = volume de enzima.

A concentração de proteína solúvel na solução estoque de enzima foi determinada de acordo com o método de Bradford (BRADFORD, 1976), utilizando albumina de soro bovino (BSA) como proteína padrão para construir a curva de calibração na faixa de 0 a 750 mg/L. Todas as amostras foram preparadas usando água Milli-Q em triplicata.

Lactozym 3000 L HP G exibiu uma concentração de proteína de $(32,9 \pm 0,243)$ g/L. A *Kl*- β -Gal é uma enzima tetramérica descrita como um dímero de dímeros, em que cada subunidade é idêntica e possui massa molecular de 119 kDa, contendo 1024 aminoácidos (PEREIRA-RODRIGUEZ *et al.*, 2012). Neste trabalho, a concentração da enzima é baseada no número de mols de subunidades da enzima e a maioria dos ensaios teve um valor inicial de $2,42 \times 10^{-7}$ mol/L, denotado por E_0 . Esta concentração corresponde a uma atividade enzimática de 5,8 U/mL no reator. A concentração molar da enzima foi determinada assumindo que toda a proteína presente na solução de enzima é da *Kl*- β -Gal.

3.2.2.1 Estabilidade Enzimática

O ensaio de estabilidade da enzima foi realizado em triplicata. A enzima foi incubada em tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7 e 40 °C, na presença de 10 mM de NaCl e 1,5 mM de MgCl₂ (cofatores). Em intervalos de tempos pré-definidos, as amostras foram retiradas e imediatamente medidas para determinar a atividade residual utilizando o método de atividade do ONPG, conforme procedimento descrito no item 3.2.2, mas usando uma temperatura de 37 °C.

3.2.3 Síntese Enzimática de Galacto-Oligossacarídeos

As reações de hidrólise e transgalactosilação da lactose foram realizadas utilizando um reator em batelada com volume de 25 mL. Os ensaios foram conduzidos através da variação da concentração de lactose de 103 até 400 g/L. As soluções foram preparadas em 50 mM de tampão fosfato de potássio, pH 7, contendo 10 mM de NaCl e 1,5 mM de MgCl₂. A lactose foi dissolvida aquecendo-se a solução em 95 °C, em seguida a temperatura foi resfriada e mantida a 40 °C. A reação foi iniciada adicionando-se 5,8 U/mL da *Kl*- β -Gal e foi conduzida por 10 h. Em intervalos pré-definidos de tempo as amostras foram retiradas e submetidas a um banho de água de 90 °C por 3 minutos, para a inativação da enzima. Posteriormente, essas amostras foram diluídas, filtradas e quantificadas através de HPLC.

3.2.3.1 Síntese Enzimática de GOS na Presença de Sais

Soluções com concentração inicial de 220 g/L de lactose pura ou presente em permeado do soro de leite foram utilizados como substrato. Essa concentração foi usada para garantir que a lactose estivesse completamente solúvel no meio reacional. Diferentes concentrações de sais de cloreto de sódio, magnésio, potássio e cálcio foram adicionadas às soluções de lactose pura para verificar a influência desses sais na velocidade inicial de síntese

(r_{GOS}) e hidrólise (r_{Gal}), seletividade (r_{GOS}/r_{Gal}) e atividade total da β -galactosidase ($r_{GOS} + r_{Gal}$). A condição de operação dos ensaios foi a mesma do item 3.2.3, com exceção do tempo de reação que foi de 30 minutos quando utilizado velocidade inicial. Contudo, alguns ensaios foram conduzidos até 10 h de reação e outros ainda, foram aumentados à concentração inicial de lactose presente no permeado. Foram realizados ensaios dessa forma com o intuito de observar as diferenças na cinética da reação. Depois, as amostras foram analisadas por meio de HPLC.

3.2.3.2 Síntese Enzimática de GOS na Presença de Galactose

Foram realizados ensaios utilizando como substrato galactose pura na concentração de 54 g/L. Ou ainda, foi adicionado 5% de galactose (50 g/L) a lactose na concentração de 274 g/L.

3.2.3.3 Síntese Enzimática de GOS na Presença de Tampão PEM

Um dos ensaios utilizando permeado do soro de leite na concentração de lactose de 220 g/L foi conduzido na presença do tampão fosfato-EDTA-magnésio (PEM) pH 6,5 de acordo com Food Chemicals Codex (FCC) V (FOOD CHEMICALS CODEX, 2003). Também foi realizado ensaio utilizando tampão fosfato-EDTA-magnésio (PEM) com força iônica de 50 mM e pH 7.

3.2.3.4 Análises em HPLC

A lactose e os produtos da reação foram analisados por HPLC Shimadzu contendo degaseificador DGU-20A5R, alto injetor SIL 10 ADVP, detector de índice de refração (RID-10A), forno de coluna CTO-20A, todos controlados por controlador SCL-10A VP. Foi utilizada uma coluna de troca iônica SUPELCOGEL Ca^{2+} (30 cm x 7,8 mm) fabricada pela Sigma-Aldrich. As amostras foram eluídas com água Milli-Q em uma vazão de 0,5 mL/min. O detector e a coluna foram mantidos a 40 °C e 80 °C, respectivamente. Também foi utilizada uma coluna Sugar-Pak (300 x 6,5) mm fabricada pela Waters. Neste caso, a fase móvel usada foi 50 mg/L EDTA Ca^{2+} e a coluna foi mantida a uma vazão de 0,5 mL/min. A temperatura da coluna e do detector também foram respectivamente 80 °C e 40 °C. O *software* LC solution foi utilizado para integrar os cromatogramas. A identificação dos diferentes carboidratos foi feita utilizando calibração externa baseado em padrões disponíveis comercialmente (vide Figura 3.1). Este método analítico não pode diferenciar entre diferentes di, tri e tetrassacarídeos. Portanto, a concentração experimental de dissacarídeo é a soma das

concentrações de lactose, galactobiose e alolactose. A concentração experimental de trissacarídeo é a soma de D-glicose- $[\beta\text{-D-galactose}]_2$ e $[\beta\text{-D-galactose}]_3$ e assim por diante.

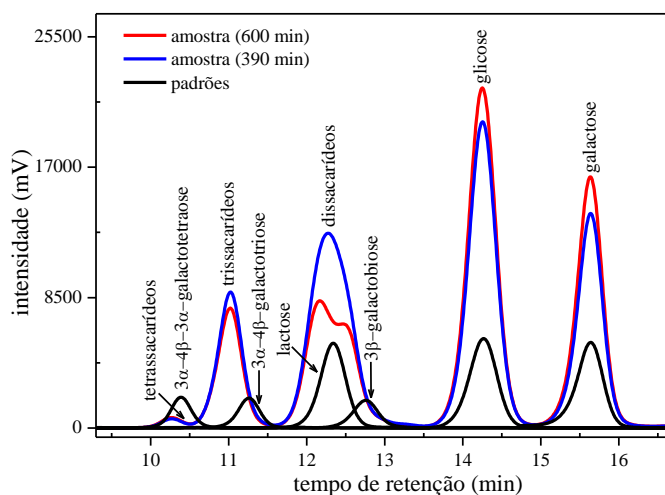


Figura 3.1 - Cromatograma de amostras durante a síntese de GOS usando HPLC-RID e uma coluna SUPELCOGEL Ca⁺². Ensaio com uma concentração inicial de lactose (CIL) de 0,64 M e $E = 0,5E_0$.

Fonte: Elaborado pela autora.

É importante destacar, como dito anteriormente (item 2.5), que a enzima utilizada neste trabalho tem preferência pelas ligações $\beta(1\rightarrow6)$. Pois conforme relatado na literatura, seus principais produtos são os dissacarídeos alolactose e 6-galactobiose, e o trissacarídeo 6'galactosil-lactose (FRENZEL *et al.*, 2015; MARTÍNEZ-VILLALUENGA *et al.*, 2008; RODRIGUEZ-COLINAS *et al.*, 2011, 2013, 2014; YIN *et al.*, 2017). Conforme apresentado na Figura 3.1, os padrões de GOS compostos apenas por resíduos de galactosil (galactobiose, galactotriose e galactotetraose), mesmo com diferentes ligações glicosídicas, não podem ser facilmente separados dos sacarídeos obtidos das amostras de reação usando a *Kl*- β -Gal. Uma vez que, este método analítico não tem uma boa resolução para diferenciar entre diferentes di, tri e tetrassacarídeos, a concentração experimental de dissacarídeo foi considerada como a soma das concentrações de lactose, galactobiose e alolactose (não incluída no modelo). A concentração experimental de trissacarídeo é a soma de D-glicose- $[\beta\text{-D-galactose}]_2$ e $[\beta\text{-D-galactose}]_3$ e assim por diante. Embora os tempos de retenção dos padrões de GOS sejam diferentes das amostras, esses padrões fornecem uma indicação qualitativa do tempo de retenção em função do tamanho dos oligossacarídeos.

3.2.4 Estimação de Parâmetros

O modelo foi construído em base molar e as massas molares usadas para mono, di, tri e tetrassacarídeos foram 180,16; 342,30; 504,44 e 666,58 g/mol, respectivamente. Os

parâmetros do modelo cinético foram ajustados aos dados experimentais de diferentes ensaios utilizando experimentos replicados (duplicata ou triplicata) e lactose como substrato na síntese enzimática de GOS. Os ajustes dos parâmetros foram realizados por regressão não linear utilizando a função *simulannealbnd* do *software* Matlab®, que adota simulated annealing para resolver o problema de otimização. $J(\theta)$ apresentando na Equação 3.2 representa a função objetivo que corresponde à soma do erro quadrado.

$$J(\theta) = \sum_{k=1}^l \sum_{j=1}^m \sum_{i=1}^n (\tilde{y}_{ijk} - \varphi_{ijk}(\theta))^2 \quad (3.2)$$

Em que:

θ = vetor de parâmetros ajustáveis;

φ = modelo (dados simulados);

\tilde{y} = vetor de variáveis medidas (dados experimentais);

i = pontos no tempo;

j = espécies presentes na reação;

k = pontos experimentais da i -ésima espécie;

l = número de experimentos;

m = número de variáveis;

n = número de pontos de amostragem.

Os parâmetros são ajustados aos dados experimentais usando um algoritmo interno do *software* MATLAB. Um método de bootstrap, baseado nos resíduos obtidos durante a estimativa dos parâmetros para inferência estatística foi utilizado para calcular os intervalos de confiança dos parâmetros e analisar a correlação paramétrica. O método de bootstrap utilizado segue a abordagem proposta pela análise das propriedades atuais do sistema por meio de elementos estocásticos e simulações repetidas. Considerando que é impossível repetir um experimento por centenas de vezes, o método de Monte Carlo é utilizado para simular os dados (JOSHI; SEIDEL-MORGENSTERN; KREMLING, 2006). Ou seja, os valores ótimos dos parâmetros obtidos durante os procedimentos de ajuste são usados com a variância do resíduo para simular os dados experimentais usados nos ajustes. Um novo ajuste aos dados simulados é realizado. Portanto, neste momento, usando a função *fmincon* do Matlab®. Este procedimento é repetido 2000 vezes (quando os parâmetros de distribuição se tornam constantes) fornecendo um conjunto de novas inferências do vetor de parâmetros. A matriz resultante (número de parâmetros versus número de execuções) é usada para inferir os erros padrão e os intervalos de confiança de 95% dos parâmetros.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CARACTERIZAÇÃO DO PERMEADO DO SORO EM RELAÇÃO AOS SAIS

A caracterização do permeado do soro de leite foi realizada. Isto é importante devido à variação da sua composição dependendo da fonte de leite utilizada e dos processos de coagulação do leite e ultrafiltração do soro.

Foi utilizado um único permeado do soro de leite durante todos os experimentos e este foi mantido em temperatura ambiente. Assim, esse permeado foi caracterizado em relação aos sais presentes considerando uma solução de lactose de 220 g/L (vide Tabela 4.1) utilizando o procedimento descrito no item 3.2.1. Também foi feito em trabalho preliminar a caracterização em relação à concentração de proteína (m/m - $2,11 \pm 0,06\%$), teor de lactose (mLac/mper - 82,2%), umidade (8,9%) e a quantidade de sais totais (7,3%) presentes no permeado (SCHULTZ, 2016).

Tabela 4.1 - Composição dos sais do permeado do soro de leite.

Componente	Permeado do soro (mM) \pm desvio padrão (mM)
Ca ²⁺	36,96 \pm 1,09
Mg ²⁺	11,96 \pm 0,15
Na ⁺	51,39 \pm 1,07
K ⁺	6,73 \pm 0,06

Fonte: Elaborado pela autora.

4.1.1 Influência dos Sais na Síntese Enzimática de GOS

Depois de analisar a composição do permeado do soro conforme resultado obtido no item 4.1, foram realizadas reações durante 10 h, para verificar a influência de se colocar exatamente a mesma concentração de sais existente no permeado do soro, quando é utilizada uma CIL = 0,64 M (220 g/L). Ou seja, os objetivos desses ensaios foram verificar a influência de diferentes substratos sobre a síntese de GOS e imitar o efeito do permeado para observar como esses fatores afetam a atividade de hidrólise e de transgalactosilação da K1- β -Gal. Assim, os sais foram adicionados individualmente em cada experimento para verificar o comportamento na cinética da reação (vide Figura 4.1).

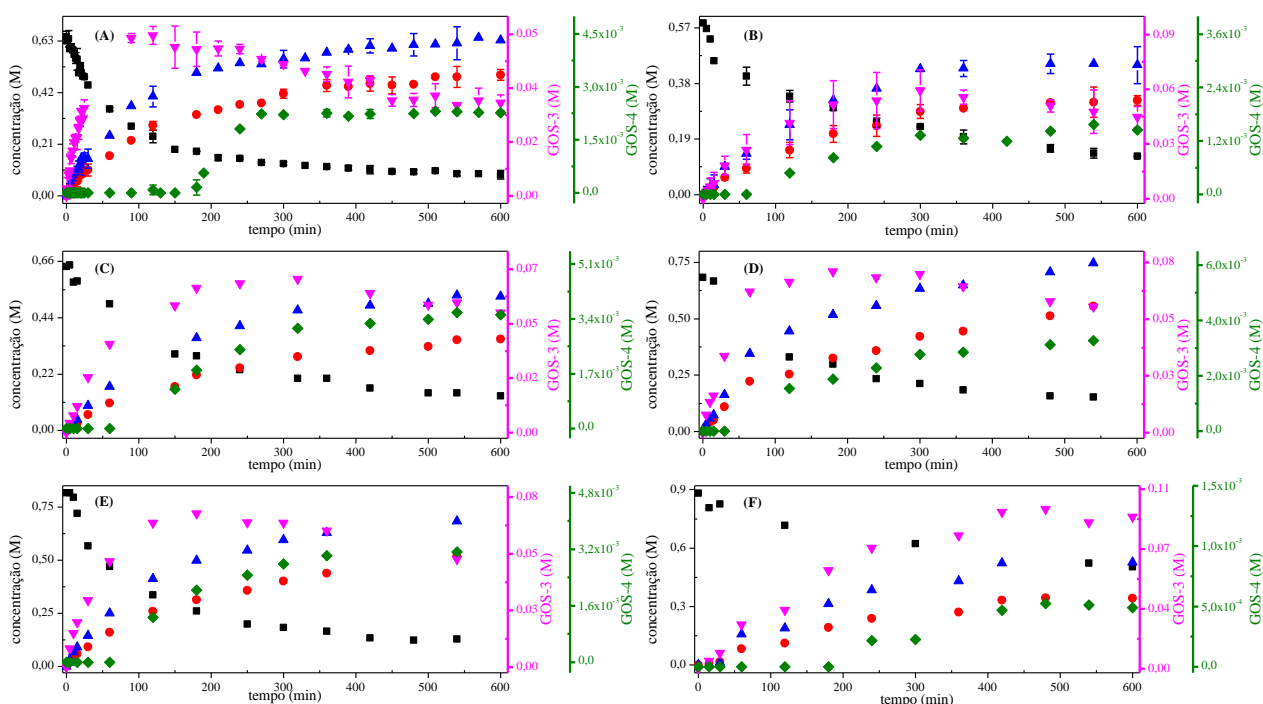


Figura 4.1 - Síntese de GOS usando tampão fosfato de potássio (50 mM, pH 7), 40 °C e concentração de *Kl*-β-Gal de 5,8 U/mL. (A) CIL = 0,64 M, (B) CIL = 0,64 M (substrato = permeado), (C) CIL = 0,64 M + 51,4 mM Na⁺, (D) CIL = 0,64 M + 12 mM Mg²⁺, (E) CIL = 0,64 M + 6,7 mM K⁺, (F) CIL = 1,17 M, (substrato = permeado). Di = Lac + Glb (■), GOS-3 = Tri + Trig (▼), GOS-4 = Tet + Tetg (◆), Gli (▲) e Gal (●). As barras de erro correspondem ao desvio padrão (d.p.) das réplicas de ensaios (2 ou 3).

Fonte: Elaborado pela autora.

Na Figura 4.1 estão apresentados o consumo de dissacarídeo (Di), a formação dos produtos glicose (Gli), galactose (Gal), trissacarídeos (GOS-3) e tetrassacarídeos (GOS-4). É importante observar que o dissacarídeo apresentado na Figura 4.1 é a soma das concentrações de lactose (Lac) e galactobiose (Glb), visto que a separação completa desses dois dissacarídeos durante a análise por HPLC acoplado ao detector de índice de refração (RID) com uma única coluna (p. ex. coluna de troca iônica) não é possível em determinados instantes da reação. Isso ocorre porque o pico de lactose se sobrepõe ao pico de galactobiose, especialmente no início da reação, pois o meio de reação tem uma alta concentração de lactose. Essa dificuldade em separar a galactobiose da lactose também já foi reportado anteriormente na literatura (BAKKEN; HILL; AMUNDSON, 1992; PALAI; BHATTACHARYA, 2013; VERA *et al.*, 2011). Na Tabela 4.2 estão apresentados os tempos e as concentrações máximas de GOS-3, GOS-4 e galactose obtidos durante a síntese de GOS indicada na Figura 4.1A-F. De acordo com os resultados apresentados na Tabela 4.2, GOS-4 foi formado em todas as condições, mas suas concentrações máximas são muito baixas.

Tabela 4.2 - Concentrações máximas de GOS-3, GOS-4 e galactose obtidas na Figura 4.1A-F.

		Figura 4.1					
		A	B	C	D	E	F
GOS-3	concentração (mM)	53,6	59,5	67,9	71,0	67,8	96,1
	tempo (min)	120	300	320	180	180	480
GOS-4	concentração (mM)	2,21	1,58	3,60	3,28	3,12	0,52
	tempo (min)	300	540	540	540	540	480
galactose	concentração (mM)	492	322	357	557	519	342
	tempo (min)	600	600	600	540	540	600

Fonte: Elaborado pela autora.

Em suma, a transgalactosilação, que é a reação de formação de GOS, foi favorecida quando íons de sódio, potássio ou magnésio foram adicionados separadamente em comparação à lactose pura. A formação de tetrassacarídeo (GOS-4) foi maior na presença do sódio, seguido de magnésio, potássio, lactose, permeado do soro de leite na CIL de 220 g/L e por fim permeado do soro de leite na CIL de 400 g/L (1,17 M) (vide Tabela 4.2). Essa formação maior de GOS-4 na presença de sódio pode estar correlacionada com o fato desse íon favorecer a atividade de transgalactosilação e inibir a atividade de hidrólise, que neste caso, foi representada pela formação da galactose (vide Figura 4.1C) (MONTILLA; CORZO; OLANO, 2012; MOZAFFAR; NAKANISHI; MATSUNO, 1985; VOGET *et al.*, 1994). A formação de trissacarídeo (GOS-3) foi maior na presença de permeado do soro de leite na CIL de 400 g/L, seguindo por magnésio, potássio e sódio, depois por permeado do soro de leite na CIL de 220 g/L e por fim lactose (Tabela 4.2). O fato do permeado do soro de leite na CIL de 400 g/L produzir mais GOS-3 do que os outros ensaios foi um efeito interessante e não era esperado, pois ao usar uma concentração de lactose mais alta no soro de leite, a concentração de inibidores e ativadores também aumenta. Contudo, a concentração de ativadores aumenta similarmente sendo capaz de ocorrer efeitos sinérgicos que podem compensar os efeitos negativos que os inibidores poderiam exercer sobre a síntese de GOS (FISCHER; KLEINSCHMIDT, 2015, 2018).

De acordo com a Tabela 4.2 pode-se perceber que a atividade de hidrólise foi maior quando se adicionou magnésio. Este efeito era esperado pois o efeito benéfico desse íon até certa faixa para a hidrólise da lactose pela *Kl-β-Gal* já foi reportado anteriormente (vide Tabela 2.3) (ATYAKSHEVA *et al.*, 2007; KIM; JI; OH, 2003; KIM, S.; LIM; KIM, 1997). A segunda maior atividade de hidrólise foi obtida usando o potássio, seguido por lactose, sódio, permeado do soro de leite na CIL de 400 g/L e por último permeado do soro de leite na CIL de 200 g/L (vide Tabela 4.2). O fato dessa enzima exibir maior atividade hidrolítica na presença de potássio do que na presença de sódio foi consistente com os resultados apresentados anteriormente na literatura (MONTILLA; CORZO; OLANO, 2012). Permeado

do soro de leite na CIL de 400 g/L e de 200 g/L serem os ensaios que mais inibiram a hidrólise da lactose era esperado e concordam com os resultados apresentados neste trabalho, pois sabe-se que na presença de potássio, a inibição da hidrólise da lactose ainda é mais acentuada pelo íon sódio (vide Fig. 4.1B e Fig. 4.1F) (FLORES; ERTOLA; VOGET, 1996).

4.1.1.1 Influência de Cátions nas Velocidades Iniciais de Síntese de GOS e Hidrólise da Lactose, Seletividade e Atividade Total

Na composição do permeado do soro de leite existem concentrações consideráveis de cátions (Na^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} e K^+) (vide Tabela 4.1), que podem afetar a atividade de hidrólise e transgalactosilação da enzima *Kl*- β -Gal (FISCHER; KLEINSCHMIDT, 2015; LIEPINS; CIPROVICA; ZOLNERE, 2017; MOZAFFAR; NAKANISHI; MATSUNO, 1985; VOGET *et al.*, 1994). Dessa forma, na Figura 4.2 estão apresentados ensaios nos quais foram adicionados íons tais como: sódio, magnésio, potássio e cálcio, sozinhos ou combinados em uma solução de lactose de 220 g/L, com o objetivo de entender o efeito que esses íons causam na velocidade inicial de síntese (r_{GOS}) e hidrólise (r_{Gal}), seletividade ($r_{\text{GOS}}/r_{\text{Gal}}$) e atividade total da *Kl*- β -Gal ($r_{\text{GOS}} + r_{\text{Gal}}$) e, imitar o comportamento do permeado (vide Figura 4.2A-B). Na Figura 4.2, também está apresentado ensaio de velocidade inicial usando o permeado como substrato na CIL de 220 g/L.

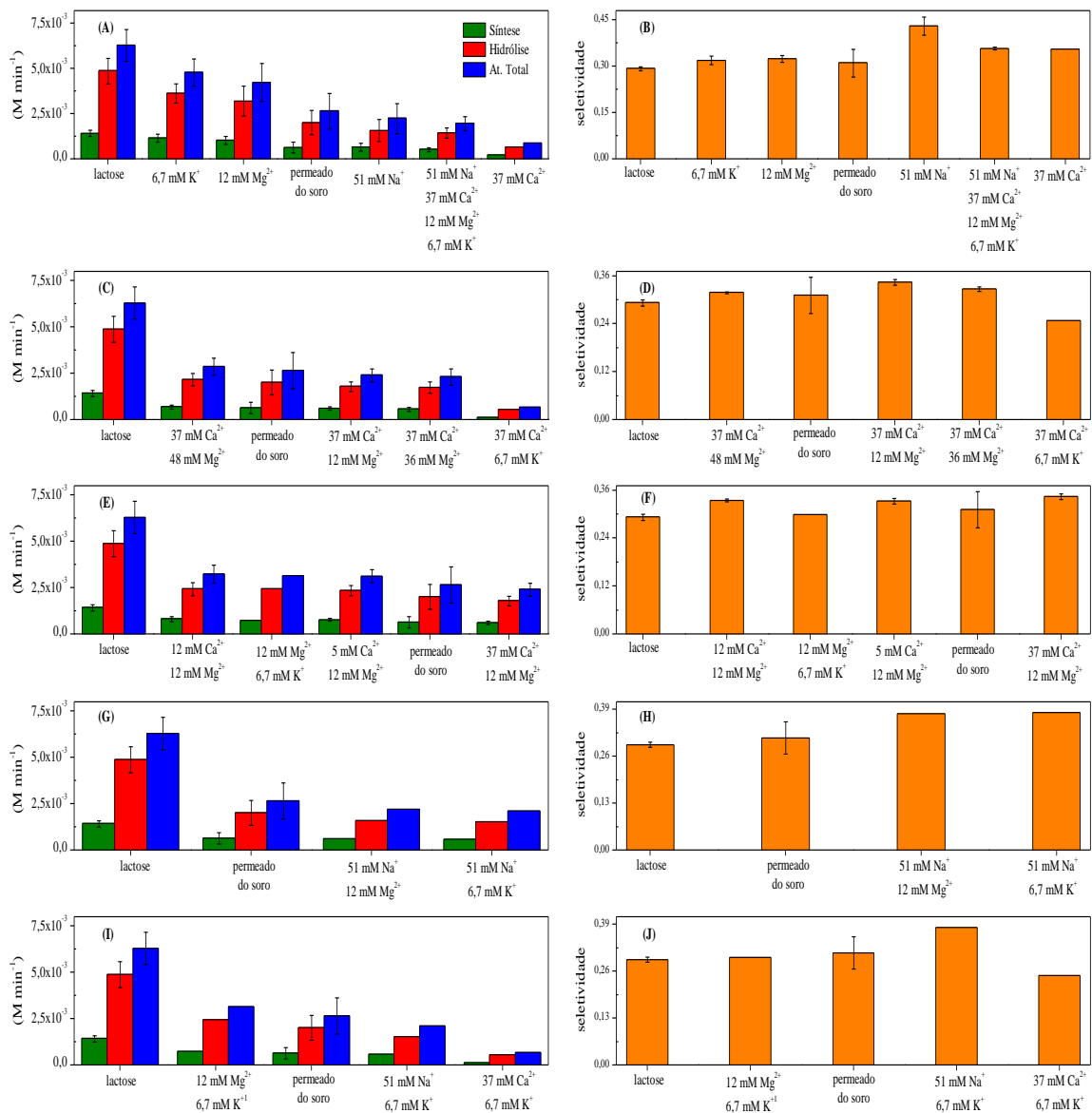


Figura 4.2 - Velocidades iniciais de síntese e hidrólise, atividade total da *KI-β-Gal* (A, C, E, G e I) e seletividade (B, D, F, H e J) da reação de síntese de GOS usando concentração de enzima de 5,8 U/mL e CIL de 0,64 M. Ensaio foram realizados em tampão fosfato de potássio (50 mM, pH 7), 40 °C e 30 minutos de reação. As barras de erro correspondem ao desvio padrão (d.p.) das réplicas de ensaios (2).

Fonte: Elaborado pela autora.

Nos ensaios apresentados na Figura 4.2A-B é importante ressaltar que a concentração de sal utilizada em cada ensaio foi a mesma concentração encontrada no permeado do soro de leite conforme apresentada na Tabela 4.1. Dessa maneira, como dito anteriormente, esses ensaios foram realizados com o objetivo de imitar o permeado (ensaio com todos os íons juntos) e entender o efeito que cada sal provoca na velocidade inicial de síntese e hidrólise, atividade total e seletividade. Para verificar se os resultados obtidos na Figura 4.2 são estatisticamente diferentes, foi realizada uma análise de variância (analysis of

variance - ANOVA) seguida pelo teste de Tukey para corroborar qual dos ensaios realizados apresenta diferenças entre si. Dessa forma, na Tabela 4.3 estão apresentados resultados dessas análises. Pode-se verificar que a velocidade inicial de síntese e hidrólise, atividade total (Figura 4.2A) e seletividade (Figura 4.2B) são significativamente diferentes, pois seus valores-p obtidos pela ANOVA com um fator apresentados na Tabela 4.3 são inferiores a 0,05. Assim, com a utilização do teste de Tukey foi possível verificar com 95% de confiança que para a velocidade inicial de síntese somente o ensaio de lactose em comparação com todos os íons (51 mM Na⁺, 37 mM Ca²⁺, 12 mM Mg²⁺, 6,7 mM K⁺) apresentaram diferenças significantes. Então, pode-se notar que, dentro da região estudada, a r_{GOS} foi maior quando se utilizou lactose pura como substrato seguido pelo ensaio com todos os íons. Para a velocidade inicial de hidrólise e atividade total indicado na Figura 4.2A e Tabela 4.3 seguiu a seguinte ordem: lactose pura > permeado do soro de leite, lactose pura > 51 mM Na⁺, e lactose pura > todos os íons. A seletividade indicada na Figura 4.2B e Tabela 4.3 obedeceu a seguinte sequência: 51 mM Na⁺ > 12 mM Mg²⁺, 51 mM Na⁺ > 6,7 mM K⁺, 51 mM Na⁺ > permeado, e 51 mM Na⁺ > lactose pura.

Tabela 4.3 - ANOVA e teste de Tukey realizados nos resultados apresentados na Figura 4.2A-B.

pares de tratamentos	Figura 4.2A				Figura 4.2B			
	síntese		hidrólise		atividade total		seletividade	
	valor-p = 0,0323		valor-p = 0,0087		valor-p = 0,0118		valor-p = 0,0090	
	valor-p de Tukey HSD	inferência de Tukey HSD	valor-p de Tukey HSD	inferência de Tukey HSD	valor-p de Tukey HSD	inferência de Tukey HSD	valor-p de Tukey HSD	inferência de Tukey HSD
lactose vs permeado		in.	0,0275	* p < 0,05	0,0344	* p < 0,05		in.
lactose vs 51 mM Na ⁺		in.	0,0141	* p < 0,05	0,0212	* p < 0,05	0,0078	** p < 0,01
lactose vs todos os íons (51 mM Na ⁺ , 37 mM Ca ²⁺ , 12 mM Mg ²⁺ , 6,7 mM K ⁺)	0,0405	* p < 0,05	0,0118	* p < 0,05	0,0155	* p < 0,05		in.
6,7 mM K ⁺ vs 51 mM Na ⁺		in.		in.		in.	0,0222	* p < 0,05
12 mM Mg ²⁺ vs 51 mM Na ⁺		in.		in.		in.	0,0268	* p < 0,05
permeado vs 51 mM Na ⁺		in.		in.		in.	0,0159	* p < 0,05

in. = insignificante.

Fonte: Elaborado pela autora.

Na maioria dos ensaios apresentado na Figura 4.2C e Figura 4.2D foram feitas combinações de dois sais, sendo um deles 37 mM de Ca²⁺. Essas combinações somente não foram feitas para o permeado e para a lactose sem a presença de sais. Pela ANOVA

apresentada na Tabela 4.4, as r_{GOS} , r_{Gal} e a $r_{GOS} + r_{Gal}$ são significativamente diferentes, exceto a r_{GOS}/r_{Gal} que apresentou valor-p superior a 0,05, indicando que há muito ruído e aleatoriedade nesses dados. Pelo teste de Tukey, pode-se inferir que a r_{GOS} , r_{Gal} e a $r_{GOS} + r_{Gal}$ seguiram essa ordem: lactose > 37 mM Ca^{2+} e 48 mM Mg^{2+} , lactose > permeado, lactose > 37 mM Ca^{2+} e 12 mM Mg^{2+} , e lactose > 37 mM Ca^{2+} e 36 mM Mg^{2+} (vide Figura 4.2C e Tabela 4.4). Com esses resultados pode-se perceber que não acarreta em diferença significativa nos valores de r_{GOS} , r_{Gal} e $r_{GOS} + r_{Gal}$ dos ensaios em que cálcio foi mantido fixo (37 mM) e variou-se a concentração de magnésio (12 mM até 48 mM). Isso pode indicar que dentro da faixa investigada, aumentar a quantidade de magnésio no meio com a mesma concentração de cálcio não está afetando os fatores analisados neste item. Embora não apresentado na Figura 4.2, também foi feito um experimento adicionando-se 51 mM Na^+ mais 37 mM Ca^{2+} em lactose, contudo, este não apresentou r_{GOS} , r_{Gal} , $r_{GOS} + r_{Gal}$ e r_{GOS}/r_{Gal} . Esse resultado é consistente com os dados apresentados por Mozaffar, Nakanishi e Matsuno (1985). Os autores utilizaram uma concentração de cálcio (5 mM) inferior a usada na Figura 4.2C e Figura 4.2D e relataram uma perda de atividade relativa de 32% e o sódio com a mesma concentração (51 mM) teve uma perda de atividade relativa de 45%, assim, se considerarmos esses dois efeitos o resultado obtido concorda com a literatura.

Tabela 4.4 - ANOVA e teste de Tukey realizados nos resultados apresentados na Figura 4.2C-D.

pares de tratamentos	Figura 4.2C				Figura 4.2D			
	síntese		Hidrólise		atividade total		seletividade	
	valor-p = 0,0191		valor-p = 0,0061		valor-p = 0,0078		valor-p = 0,2959	
	valor-p de Tukey HSD	inferência de Tukey HSD	valor-p de Tukey HSD	inferência de Tukey HSD	valor-p de Tukey HSD	inferência de Tukey HSD	valor-p de Tukey HSD	inferência de Tukey HSD
lactose vs 37 mM Ca^{2+} e 48 mM Mg^{2+}	0,0429	* p < 0,05	0,01529	* p < 0,05	0,0191	* p < 0,05		in.
lactose vs permeado	0,0325	* p < 0,05	0,01179	* p < 0,05	0,0147	* p < 0,05		in.
lactose vs 37 mM Ca^{2+} e 12 mM Mg^{2+}	0,0285	* p < 0,05	0,008587	** p < 0,01	0,0111	* p < 0,05		in.
lactose vs 37 mM Ca^{2+} e 36 mM Mg^{2+}	0,0229	* p < 0,05	0,007974	** p < 0,01	0,0099	** p < 0,01		in.

in. = insignificante.

Fonte: Elaborado pela autora.

Na maior parte dos ensaios da Figura 4.2E e Figura 4.2F foram feitas combinações de dois sais (Mg^{2+} e Ca^{2+}). Para o Mg^{2+} foi usada concentração constante (12 mM) e para o Ca^{2+} variou-se sua concentração. Essa combinação de íons somente não foi

utilizada nos ensaios de lactose, permeado e 12 mM Mg²⁺ mais 6,7 mM K⁺. Pela ANOVA apresentada na Tabela 4.5, as r_{GOS}/r_{Gal} não são significativamente diferentes, exceto as r_{GOS}, r_{Gal} e as r_{GOS} + r_{Gal} que apresentaram valores-p inferiores a 0,05. Por meio do teste de Tukey obtiveram quais experimentos apresentaram diferenças entre si. Para a r_{GOS} alcançou-se a seguinte ordem: lactose > permeado, e lactose > 37 mM Ca²⁺ e 12 mM Mg²⁺. A r_{Gal} e r_{GOS} + r_{Gal} seguiram a seguinte sequência: lactose > 12 mM Ca²⁺ e 12 mM Mg²⁺, lactose > 5 mM Ca²⁺ e 12 mM Mg²⁺, lactose > permeado, e lactose > 37 mM Ca²⁺ e 12 mM Mg²⁺. Pode-se analisar que os ensaios nos quais o magnésio foi mantido com concentração constante e a concentração de cálcio foi modificada não provocaram diferenças significativas. Diante disso, pode-se perceber que aumentar a concentração de cálcio de 5 mM até 12 mM e manter constante a concentração de magnésio (12 mM), não acarreta em efeito sobre as variáveis observadas (r_{GOS}, r_{Gal}, r_{GOS} + r_{Gal}) dentro da faixa analisada nas Figuras 4.2E e Figura 4.2F. Um fato parecido também foi observado por Mozaffar, Nakanishi e Matsuno (1985) que utilizou uma concentração de Mg²⁺ de 0 mM até 10 mM e não ocorreu redução da atividade da enzima *KI-β-Gal*. Quando os autores utilizaram uma concentração de 2 mM de Mg²⁺ a atividade aumentou para 110%. Quanto ao cálcio em presença de lactose na concentração de 5 mM, os autores reportaram perda de atividade da enzima (32%). Assim, nos resultados apresentados na Figura 4.2E e Figura 4.2F ao aumentar a concentração de cálcio para 12 mM esperava-se a redução das atividades, como isso não aconteceu, os resultados sugerem que a concentração de magnésio utilizada conseguiu compensar os efeitos negativos causados pelo aumento da concentração do cálcio nos ensaios.

Tabela 4.5 - ANOVA e teste de Tukey realizados nos resultados apresentados na Figura 4.2E-F.

pares de tratamentos	Figura 4.2E				Figura 4.2F			
	síntese		Hidrólise		atividade total		seletividade	
	valor-p = 0,0254		valor-p = 0,0079		valor-p = 0,0102		valor-p = 0,2406	
	valor-p de Tukey HSD	inferência de Tukey HSD	valor-p de Tukey HSD	inferência de Tukey HSD	valor-p de Tukey HSD	inferência de Tukey HSD	valor-p de Tukey HSD	inferência de Tukey HSD
lactose vs 12 mM Ca ²⁺ e 12 mM Mg ²⁺		in.	0,0223	* p < 0,05	0,02939	* p < 0,05		in.
lactose vs 5 mM Ca ²⁺ e 12 mM Mg ²⁺		in.	0,0194	* p < 0,05	0,02522	* p < 0,05		in.
lactose vs permeado	0,0309	* p < 0,05	0,0115	* p < 0,05	0,01421	* p < 0,05		in.
lactose vs 37 mM Ca ²⁺ e 12 mM Mg ²⁺	0,0271	* p < 0,05	0,0084	** p < 0,01	0,01076	* p < 0,05		in.

in. = insignificante.

Fonte: Elaborado pela autora.

Combinações de dois sais, sendo um deles 51 mM de Na^+ , foram feitas na maioria dos ensaios da Figura 4.2G e na Figura 4.2H, exceto nos ensaios com lactose e permeado. Na Figura 4.2I e Figura 4.2J, também foram feitas combinações de dois sais, sendo um deles 6,7 mM de K^+ . Tanto o potássio quanto o segundo sal utilizado estavam na concentração encontrada no permeado do soro de leite para uma CIL de 220 g/L, conforme exibido na Tabela 4.1. Pode-se observar que pela ANOVA apresentada na Tabela 4.6 todas as respostas (r_{GOS} , r_{Gal} , $r_{\text{GOS}} + r_{\text{Gal}}$ e $r_{\text{GOS}}/r_{\text{Gal}}$) observadas na Figura 4.2G-J não são significativamente diferentes para o nível de significância de 95% de confiança. Assim, mesmo aplicando o teste de Tukey não foi possível obter quais pares diferem entre si.

Tabela 4.6 - ANOVA e teste de Tukey realizados nos resultados apresentados na Figura 4.2G-J.

pares de tratamentos	Figura 4.2G e Figura 4.2I				Fig. 4.2H e Fig. 4.2J			
	síntese		hidrólise		atividade total		seletividade	
	valor-p = 0,0858		valor-p = 0,0537		valor-p = 0,0593		valor-p = 0,6227	
	valor-p de Tukey HSD	inferência de Tukey HSD	valor-p de Tukey HSD	inferência de Tukey HSD	valor-p de Tukey HSD	inferência de Tukey HSD	valor-p de Tukey HSD	inferência de Tukey HSD
lactose vs permeado		in.		in.		in.		in.

in. = insignificante.

Fonte: Elaborado pela autora.

Em suma, os resultados apresentados na Figura 4.2 também estão expostos no Apêndice A. Na Tabela 4.7 está exibido o resultado da ANOVA e do teste de Tankey realizado para todos os experimentos apresentados na Figura 4.2. Pode-se analisar que a seletividade apresentou a seguinte ordem: 51 mM Na^+ > todos os íons (51 mM Na^+ , 37 mM Ca^{2+} , 12 mM Mg^{2+} e 6,7 mM K^+), 51 mM Na^+ > 37 mM Ca^{2+} e 12 mM Mg^{2+} , 51 mM Na^+ > 12 mM Ca^{2+} e 12 mM Mg^{2+} , 51 mM Na^+ > 5 mM Ca^{2+} e 12 mM Mg^{2+} , 51 mM Na^+ > 37 mM Ca^{2+} e 36 mM Mg^{2+} , 51 mM Na^+ > 12 mM Mg^{2+} , 51 mM Na^+ > 6,7 mM K^+ , 51 mM Na^+ > 37 mM Ca^{2+} e 48 mM Mg^{2+} , 51 mM Na^+ > permeado, 51 mM Na^+ > lactose. Esses resultados indicam que o maior valor de seletividade, dentre todos os experimentos realizados foi o de 51 mM Na^+ e depois para todos os íons juntos. O menor valor foi o ensaio com lactose pura. Dessa forma, pode-se perceber que o aumento na seletividade se deve à presença do íon sódio, uma vez que os maiores valores de seletividade obtidos estavam na presença desse íon. A menor seletividade pode-se analisar que se deve à ausência de sais, quando utilizado lactose pura. A velocidade inicial de síntese seguiu a seguinte ordem: lactose > 37 mM Ca^{2+} e 48 mM Mg^{2+} , lactose > 51 mM Na^+ , lactose > permeado, lactose > 37 mM Ca^{2+} e 12 mM Mg^{2+} ,

lactose > 37 mM Ca²⁺ e 36 mM Mg²⁺, lactose > todos os íons (51 mM Na⁺, 37 mM Ca²⁺, 12 mM Mg²⁺ e 6,7 mM K⁺). Dessa maneira, pode-se observar que os resultados sugerem que a menor r_{GOS} se deve à presença de cálcio no meio reacional.

Tabela 4.7 - ANOVA e teste de Tukey realizados nos resultados apresentados na Figura 4.2.

pares de tratamentos	Figura 4.2							
	síntese		hidrólise		atividade total		seletividade	
	valor-p = 0,0058		valor-p = 0,00079		valor-p = 0,0013		valor-p = 0,00081	
	valor-p de Tukey HSD	inferência de Tukey HSD	valor-p de Tukey HSD	inferência de Tukey HSD	valor-p de Tukey HSD	inferência de Tukey HSD	valor-p de Tukey HSD	inferência de Tukey HSD
lactose vs permeado	0,0226	* p < 0,05	0,0044	** p < 0,01	0,0064	** p < 0,01		in.
lactose vs 37 mM Ca ²⁺ e 12 mM Mg ²⁺	0,0180	* p < 0,05	0,0025	** p < 0,01	0,0039	** p < 0,01		in.
lactose vs 37 mM Ca ²⁺ e 36 mM Mg ²⁺	0,0124	* p < 0,05	0,0022	** p < 0,01	0,0032	** p < 0,01		in.
lactose vs 37 mM Ca ²⁺ e 48 mM Mg ²⁺	0,0359	* p < 0,05	0,0070	** p < 0,01	0,0102	* p < 0,05		in.
lactose vs 12 mM Ca ²⁺ e 12 mM Mg ²⁺		in.	0,0143	* p < 0,05	0,0226	* p < 0,05		in.
lactose vs 5 mM Ca ²⁺ e 12 mM Mg ²⁺		in.	0,0112	* p < 0,05	0,0175	* p < 0,05		in.
lactose vs 51 mM Na ⁺	0,0286	* p < 0,05	0,0015	** p < 0,01	0,0028	** p < 0,01	0,00043	** p < 0,01
lactose vs todos os íons (51 mM Na ⁺ , 37 mM Ca ²⁺ , 12 mM Mg ²⁺ , 6,7 mM K ⁺)	0,0081	** p < 0,01	0,0011	** p < 0,01	0,0017	** p < 0,01		in.
permeado vs 51 mM Na ⁺		in.		in.		in.	0,00106	** p < 0,01
37 mM Ca ²⁺ e 12 mM Mg ²⁺ vs 51 mM Na ⁺		in.		in.		in.	0,0114	* p < 0,05
37 mM Ca ²⁺ e 36 mM Mg ²⁺ vs 51 mM Na ⁺		in.		in.		in.	0,0032	** p < 0,01
37 mM Ca ²⁺ e 48 mM Mg ²⁺ vs 51 mM Na ⁺		in.		in.		in.	0,0017	** p < 0,01
12 mM Ca ²⁺ e 12 mM Mg ²⁺ vs 51 mM Na ⁺		in.		in.		in.	0,0055	** p < 0,01
5 mM Ca ²⁺ e 12 mM Mg ²⁺ vs 51 mM Na ⁺		in.		in.		in.	0,0048	** p < 0,01
51 mM Na ⁺ vs 12 mM Mg ²⁺		in.		in.		in.	0,0025	** p < 0,01
51 mM Na ⁺ vs		in.	0,0453	* p < 0,05		in.	0,0018	** p <

6,7 mM K ⁺						0,01
51 mM Na ⁺ vs todos os íons (51 mM Na ⁺ , 37 mM Ca ²⁺ , 12 mM Mg ²⁺ , 6,7 mM K ⁺)	in.		in.		in.	0,0404 * p < 0,05
6,7 mM K ⁺ vs todos os íons (51 mM Na ⁺ , 37 mM Ca ²⁺ , 12 mM Mg ²⁺ , 6,7 mM K ⁺)	in.	0,0312	* p < 0,05	0,0381	* p < 0,05	in.

in. = insignificante.

Fonte: Elaborado pela autora.

De todos os resultados apresentados na Figura 4.2, os pares que são significativamente diferentes para a velocidade inicial de hidrólise e a atividade total da *Kl*-β-Gal de acordo com a Tabela 4.7 foram os seguintes: lactose > 12 mM Ca²⁺ e 12 mM Mg²⁺, lactose > 5 mM Ca²⁺ e 12 mM Mg²⁺, lactose > 37 mM Ca²⁺ e 48 mM Mg²⁺, lactose > permeado, lactose > 37 mM Ca²⁺ e 12 mM Mg²⁺, lactose > 37 mM Ca²⁺ e 36 mM Mg²⁺, lactose > 51 mM Na⁺, lactose > todos os íons (51 mM Na⁺, 37 mM Ca²⁺, 12 mM Mg²⁺ e 6,7 mM K⁺), 6,7 mM K⁺ > 51 mM Na⁺, 6,7 mM K⁺ > todos os íons (51 mM Na⁺, 37 mM Ca²⁺, 12 mM Mg²⁺ e 6,7 mM K⁺). Vale ressaltar que para o par de tratamentos 6,7 mM K⁺ versus 51 mM Na⁺, não difere entre si para a atividade total da *Kl*-β-Gal (vide Tabela 4.7). Pode-se analisar que esses dados sugerem que a menor r_{Gal} e r_{GOS} + r_{Gal} se deve a presença do íon sódio juntamente com o íon potássio, depois pelo íon sódio sozinho e por fim, do íon cálcio no meio reacional. A maior r_{GOS} + r_{Gal}, r_{GOS} e r_{Gal} foi observada no ensaio de lactose pura, sem a presença de sais.

Um fato interessante observado nos ensaios da Figura 4.2 e que já foi reportado na literatura é que a inibição da hidrólise da lactose ainda é mais acentuada pelo íon sódio, na presença do íon potássio (FLORES; ERTOLA; VOGET, 1996). Esse efeito parece influenciar também na velocidade inicial de síntese e na atividade total da *Kl*-β-Gal, pois seus valores menores foram observados no ensaio com todos os íons juntos (51 mM Na⁺, 37 mM Ca²⁺, 12 mM Mg²⁺ e 6,7 mM K⁺). Ou ainda, esse efeito parece ser o mesmo quando foram realizados experimentos na presença de K⁺ e Ca²⁺ ao mesmo tempo, ou seja, o potássio também parece ativar o efeito de inibição causado pelo cálcio. Assim, os resultados sugerem que o potássio sozinho em presença de lactose é um ativador para a r_{Gal} e para a r_{GOS} + r_{Gal} da *Kl*-β-Gal (FLORES; ERTOLA; VOGET, 1996; MOZAFFAR; NAKANISHI; MATSUNO, 1985). Mas, o potássio combinado com sódio e cálcio provocam ainda mais inibição tanto da r_{GOS} + r_{Gal}

quanto da r_{GOS} e r_{Gal} . Outro fato importante a ser considerado é que a enzima *Kl*- β -Gal apresenta em seu sítio ativo um íon de magnésio e dois íons de sódio (PEREIRA-RODRIGUEZ *et al.*, 2012). Nos ensaios que apresentam ao mesmo tempo cálcio e magnésio, o cálcio pode tomar o lugar do magnésio no sítio ativo da enzima, pois ambos apresentam tamanhos similares. Esse efeito explica o fato de muitos ensaios com cálcio apresentarem valores menores nos fatores analisados nesse estudo.

4.1.2 Influência da Galactose na Síntese Enzimática de GOS

Nos resultados apresentados na Figura 4.3A, na qual 5% de galactose foi adicionado à lactose, pode-se perceber que as concentrações máximas de GOS-4, GOS-3, Gli e Gal obtidas foram respectivamente: 0,0015M, 0,066 M, 0,489 M todas em 480 min de reação e 0,50 M em 420 min. Se comparar os resultados da Figura 4.3A em que foi usada CIL = 274 g/L com os resultados da Figura 4.1A na qual foi utilizada CIL = 220 g/L, pode-se perceber que a concentração de GOS-4 obtida nesta figura é inferior a obtida a partir da Figura 4.1A (0,0022 M em 300 min). Esse resultado foi inesperado uma vez que a CIL utilizada neste item (4.1.2) é maior do que a empregada na Figura 4.1A. Contudo, como já foi reportada anteriormente na literatura, a *Kl*- β -Gal sofre inibição competitiva pela galactose, sendo esse possivelmente o fator responsável pela menor concentração de GOS-4 obtida neste ensaio (CAVAILLE; COMBES, 1995).

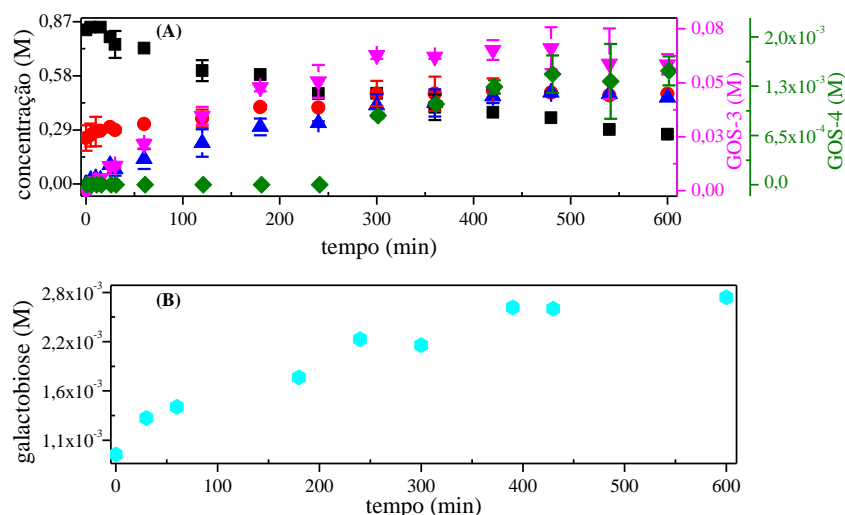


Figura 4.3 - Síntese de GOS usando concentração de *Kl*- β -Gal de 5,8 U/mL. Ensaios foram realizados em tampão fosfato de potássio (50 mM, pH 7) e 40 °C. (A) 5% de Gal em CIL = 0,80 M (274 g/L), (B) CIG = 0,3 M (54 g/L) (concentração inicial de galactose). Di = Lac + Glb (■), GOS-3 = Tri + Trig (▼), GOS-4 = Tet + Tetg (◆), Gli (▲), Gal (●) e Glb (●). As barras de erro correspondem ao desvio padrão (d.p.) das réplicas de ensaios (2).

Fonte: Elaborado pela autora.

Na Figura 4.3B está apresentado um ensaio no qual o substrato utilizado foi galactose, sem a adição de lactose. Esse ensaio foi realizado para verificar se a reação apresentada na Figura 4.6 ($\text{EGal} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{E} + \text{Gal}$) era reversível. Pode-se analisar que ocorre formação de galactobiose a partir da reação da enzima com a galactose, mas como sua velocidade de formação foi muito baixa, a reversibilidade dessa reação foi desconsiderada, e no modelo cinético foi considerada reação irreversível (vide item 4.2.1).

4.1.2.1 Velocidades Iniciais de Síntese de GOS e Hidrólise da Lactose, Seletividade e e Atividade Total

Na Figura 4.4A está apresentada atividade total da enzima, atividade de síntese e hidrólise. Pode-se perceber que a r_{Gal} e a $r_{\text{GOS}} + r_{\text{Gal}}$ seguiram a seguinte ordem: 5% galactose > lactose > permeado. A r_{GOS} obedeceu a essa ordem: lactose > permeado > 5% galactose. Já a $r_{\text{GOS}}/r_{\text{Gal}}$ seguiu a seguinte sequência: permeado > lactose > 5% galactose (vide Figura 4.4B). Pode-se analisar que o ensaio do permeado foi o mais seletivo por causa dos sais presentes em sua composição.

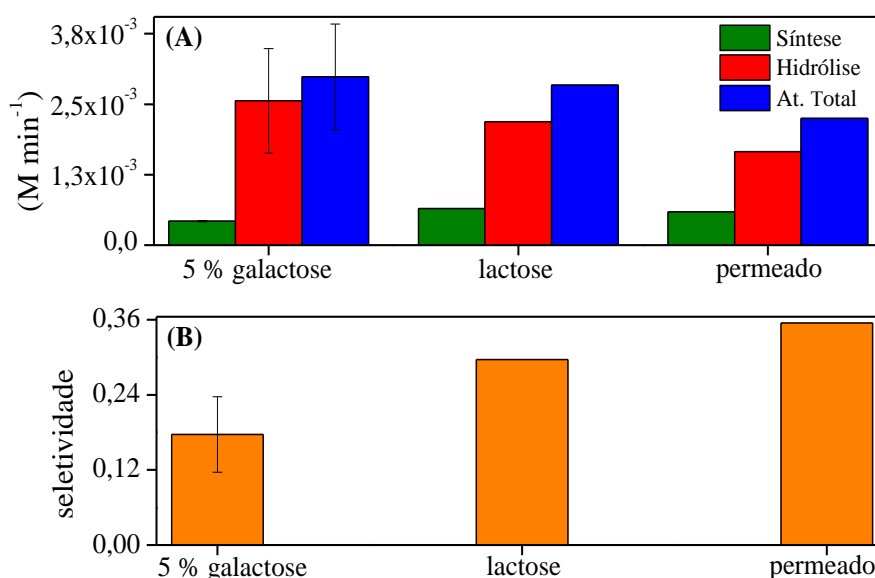


Figura 4.4 - Síntese de GOS usando uma concentração de *Kl*- β -Gal de 5,8 U/mL e CIL = 0,80 M (274 g/L). Ensaio foram realizados em tampão fosfato de potássio (50 mM, pH 7) e 40 °C. As barras de erro correspondem ao desvio padrão (d.p.) das réplicas de ensaios (2).

Fonte: Elaborado pela autora.

4.1.3 Influência do Tampão na Síntese Enzimática de GOS

Com o objetivo de verificar a influência de tampões sobre a síntese de GOS foram realizados experimentos em diferentes tampões e utilizado como substrato o permeado do soro de leite. De acordo com os resultados apresentados na Figura 4.5A até Figura 4.5C

obtiveram-se as concentrações máximas de GOS-3, GOS-4 e galactose (vide Tabela 4.8). Esses ensaios foram feitos com a finalidade de entender se o EDTA presente no tampão PEM seria capaz de formar um complexo com o cálcio e assim minimizar os impactos negativos que esse íon causa na atividade da enzima. Assim, analisando os resultados, a maior concentração de GOS-4 e de galactose foi alcançada no tampão fosfato-EDTA-magnésio (PEM) pH 6,5 (vide Figura 4.5B e Tabela 4.8), a maior concentração de GOS-3 foi atingida com o tampão PEM 50 mM e pH 7 (Figura 4.5C e Tabela 4.8). Pode-se perceber que as maiores concentrações de GOS foram obtidas com tampão em presença de EDTA. Assim, esses resultados sugerem que o EDTA conseguiu formar complexo com o íon cálcio e minimizou os impactos negativos desse íon causados sobre a atividade da enzima *Kl-β-Gal*. Esse impacto negativo desse íon já foi reportado na literatura (MOZAFFAR; NAKANISHI; MATSUNO, 1985).

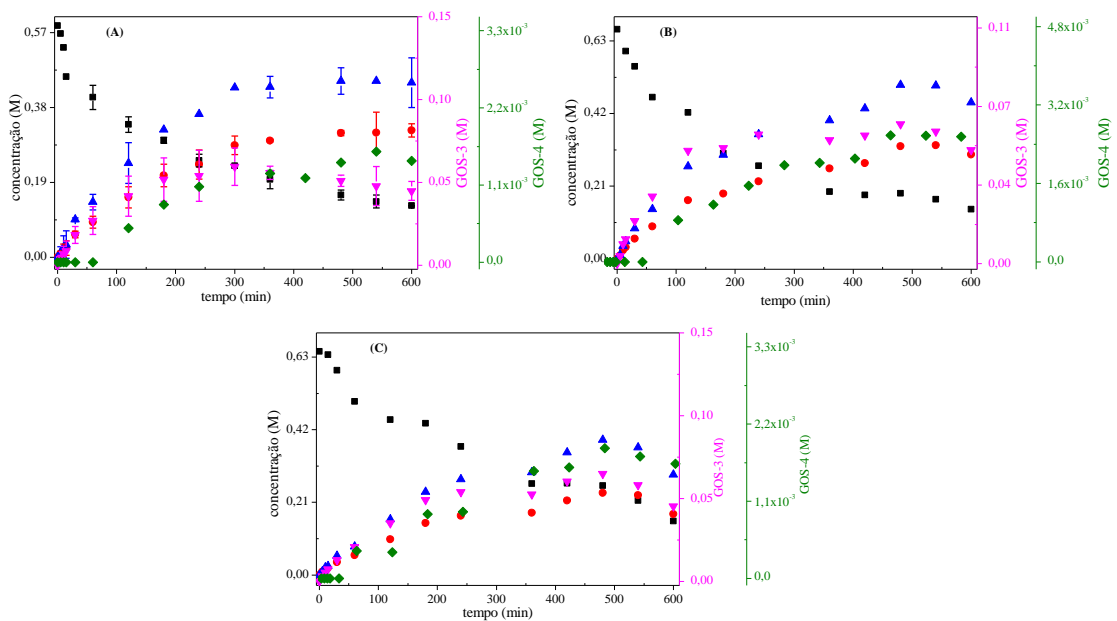


Figura 4.5 - Síntese de GOS usando 5,8 U/mL de enzima e permeado do soro de leite como substrato, CIL = 0,64 M e 40 °C. Ensaios foram realizados em (A) tampão fosfato de potássio (50 mM e pH 7), (B) tampão PEM pH 6,5 de acordo com FCC V e (C) tampão PEM (50 mM e pH 7). Di = Lac + Glb (■), GOS-3 = Tri + Trig (▼), GOS-4 = Tet + Tetg (◆), Gli (▲) e Gal (●). As barras de erro correspondem ao desvio padrão (d.p.) das réplicas de ensaios (2).

Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 4.8 - Concentrações máximas de GOS-3, GOS-4 e galactose obtidas na Figura 4.5A-C.

		Figura 4.5		
		A	B	C
GOS-3	concentração (mM)	59,5	62,2	64,9
	tempo (min)	300	480	480
GOS-4	concentração (mM)	1,58	2,58	1,86
	tempo (min)	540	480	480
galactose	concentração (mM)	322	329	237
	tempo (min)	600	540	480

Fonte: Elaborado pela autora.

4.2 MODELAGEM CINÉTICA DA SÍNTESE ENZIMÁTICA DE GALACTO-OLIGOSSACARÍDEOS: DESCRREVENDO A FORMAÇÃO DE GALACTOBIOSE

Nesta seção está apresentado um modelo desenvolvido juntamente com seu ajuste e sua validação. Esse modelo gerou um artigo no qual foi publicado na revista *Food and Bioproducts Processing* (SCHULTZ *et al.*, 2021).

4.2.1 Mecanismo de Reação e Desenvolvimento do Modelo

A formação de GOS constituída exclusivamente por moléculas de galactose tem sido reportada na literatura (FÜREDER *et al.*, 2020; MARTINEZ-VILLALUENGA *et al.*, 2008; RODRIGUEZ-COLINAS *et al.*, 2016; URRUTIA *et al.*, 2013; YAÑEZ-ÑECO *et al.*, 2017). Uma maneira fácil de avaliar experimentalmente a formação de galactobiose (Gal-Gal) (ou outros oligossacarídeos formados apenas por resíduos de galactose) é conduzida colocando a Equação 4.1 em relação ao tempo de reação. A Equação 4.1 é um pseudo balanço de resíduos de glicose e galactose e carrega uma suposição de que não há formação de GOS a partir de resíduo de galactose apenas, ou seja, a hipótese desse balanço é que todo GOS tem um terminal de glicose em sua molécula (BOON; JANSSEN; VAN DER PADT, 1999; VERA *et al.*, 2011).

$$\left(\frac{Gli}{Gal}\right)^* = \frac{Di + Gli + Tri + Tet}{Di + Gal + 2 \times Tri + 3 \times Tet} \quad (4.1)$$

4.2.2 Modelagem Cinética

Um mecanismo cinético para a hidrólise enzimática de lactose e síntese de GOS foi proposto conforme Figura 4.6.

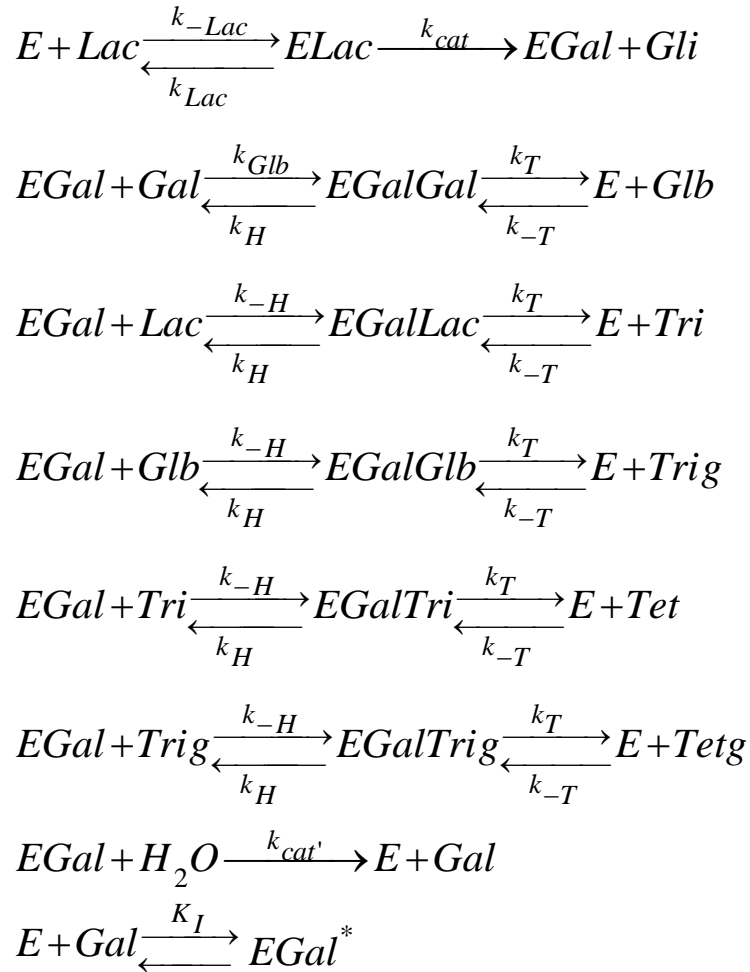


Figura 4.6 - Mecanismo cinético proposto para a síntese enzimática de GOS.

Fonte: Elaborado pela autora.

O mecanismo apresentado na Figura 4.6 foi proposto baseando-se em diversos estudos anteriores e leva em consideração a formação de complexos intermediários (BOON; JANSSEN; VAN DER PADT, 1999; BOON; JANSSEN; VAN'T RIET, 2000; KIM; JI; OH, 2004; PRENOSIL; STUKER; BOURNE, 1987; RODRIGUEZ-FERNANDEZ *et al.*, 2011; VERA *et al.*, 2011). Na Figura 4.6, *Glb*, *Trig* e *Tetg* são respectivamente galactobiose, trissacarídeo e tetrassacarídeo formados exclusivamente por galactose, enquanto *Tri* e *Tet* são trissacarídeo e tetrassacarídeo formados por galactose e um terminal de glicose. No mecanismo cinético proposto, as seguintes hipóteses são consideradas: a enzima é capaz de sintetizar dissacarídeos transgalactosilados formados por dois (galactobiose) ou mais monômeros de galactose; a liberação de glicose e galactose no meio de reação pode ser descrita como uma reação de primeira ordem em relação aos complexos intermediários; a enzima sofre inibição competitiva pela galactose ($EGal^*$). Além disso, o efeito inibitório da glicose (794 mM) é negligenciado, uma vez que é relatado ser extremamente inferior ao da

galactose (42 mM) quando a enzima *Kl*- β -Gal foi usada (CAVAILLE; COMBES, 1995). Embora a alolactose (Gal- β (1 \rightarrow 6)-Gli) também seja produzida durante a reação (FRENZEL *et al.*, 2015; MARTÍNEZ-VILLALUENGA *et al.*, 2008; RODRIGUEZ-COLINAS *et al.*, 2011, 2013, 2014; YIN *et al.*, 2017), este dissacarídeo não foi incluído no modelo uma vez que os métodos analíticos utilizados não conseguiram diferenciar esta molécula e sequer poderia ser inferido pelos balanços de massa dos resíduos.

Para o modelo cinético proposto neste trabalho, assume-se que a afinidade da enzima livre para os diferentes substratos é semelhante. Esta suposição também foi considerada por Vera *et al.* (2011) em seu modelo enzimático e é derivado da ideia de que a enzima reconhece apenas os dois primeiros resíduos do oligossacarídeo que se aproximam do sítio ativo. Todos os oligossacarídeos possuem um resíduo Gal-Gal, principalmente a ligação glicosídica β (1 \rightarrow 6) que se aproxima do sítio ativo da enzima (FRENZEL *et al.*, 2015; MARTÍNEZ-VILLALUENGA *et al.*, 2008; RODRIGUEZ-COLINAS *et al.*, 2011, 2013, 2014; YIN *et al.*, 2017). A exceção é a lactose que possui uma ligação Gal- β (1 \rightarrow 4)-Gli. Uma suposição análoga foi feita para o complexo enzima-galactosil e seus substratos usando o mesmo princípio. Como resultado, uma constante de desorção para a enzima livre e uma para o complexo enzimático foi usada.

Ao derivar as expressões da taxa de reação (Equações 4.2-4.9), uma hipótese de pseudo estado estacionário foi assumida para a concentração de complexos enzimáticos $ELac$, $EGal$, $EGalGal$, $EGalLac$, $EGalGlb$, $EGalTri$, $EGalTrig$ and $EGal^*$ e um balanço de massa sobre a carga total enzimática (E_T) foi aplicado.

$$\frac{d(Lac)}{dt} = r(Lac) = E \left[\frac{k_H \times Tri}{K_{MH}} - Lac \times \left(\frac{k_{cat}}{K_M} + \frac{\gamma \times k_T}{K_{MT}} \right) \right] \quad (4.2)$$

$$\frac{d(Gli)}{dt} = r(Gli) = E \left(\frac{k_{cat} \times Lac}{K_M} \right) \quad (4.3)$$

$$\frac{d(Gal)}{dt} = r(Gal) = E \left[\gamma \left(k_{cat'} - \frac{k_T}{K_{MGal}} \times Gal \right) + \frac{k_H}{K_{MH}} \times Glb \right] \quad (4.4)$$

$$\frac{d(Glb)}{dt} = r(Glb) = E \left[\gamma \times k_T \times \left(\frac{Gal}{K_{MGal}} - \frac{Glb}{K_{MT}} \right) + \frac{k_H}{K_{MH}} \times (Trig - Glb) \right] \quad (4.5)$$

$$\frac{d(\text{Tri})}{dt} = r(\text{Tri}) = E \left[\gamma \times \frac{k_T}{K_{MT}} \times (\text{Lac} - \text{Tri}) + \frac{k_H}{K_{MH}} \times (\text{Tet} - \text{Tri}) \right] \quad (4.6)$$

$$\frac{d(\text{Trig})}{dt} = r(\text{Trig}) = E \left[\gamma \times \frac{k_T}{K_{MT}} \times (\text{Glb} - \text{Trig}) + \frac{k_H}{K_{MH}} \times (\text{Tetg} - \text{Trig}) \right] \quad (4.7)$$

$$\frac{d(\text{Tet})}{dt} = r(\text{Tet}) = E \left[\gamma \times \frac{k_T}{K_{MT}} \times \text{Tri} - \frac{k_H}{K_{MH}} \times \text{Tet} \right] \quad (4.8)$$

$$\frac{d(\text{Tetg})}{dt} = r(\text{Tetg}) = E \left[\gamma \times \frac{k_T}{K_{MT}} \times \text{Trig} - \frac{k_H}{K_{MH}} \times \text{Tetg} \right] \quad (4.9)$$

$$\frac{d(E_T)}{dt} = r(E_T) = -k_E \times E_T \quad (4.10)$$

No qual γ , a e b estão representados pelas Equações 4.11-4.13.

$$\gamma = \frac{\frac{k_{cat}}{K_M} \times \text{Lac} + \frac{k_H}{K_{MH}} \times a}{k_{cat'} + k_T \times \left(\frac{\text{Gal}}{K_{MGal}} + \frac{b}{K_{MT}} \right)} \quad (4.11)$$

$$a = \text{Glb} + \text{Tri} + \text{Trig} + \text{Tet} + \text{Tetg} \quad (4.12)$$

$$b = \text{Lac} + \text{Glb} + \text{Tri} + \text{Trig} \quad (4.13)$$

As constantes de equilíbrio para a reação de hidrólise (K_{MH}) e transgalactosilação (K_{MT} e K_{MGal}), bem como a constante de Michaelis para lactose (K_M) e o balanço de enzima (E) estão indicados respectivamente nas Equações 4.14 a 4.18.

$$K_M = \frac{k_{cat} + k_{Lac}}{k_{-Lac}} \quad (4.14)$$

$$K_{MH} = \frac{k_H + k_T}{k_{-T}} \quad (4.15)$$

$$K_{MT} = \frac{k_H + k_T}{k_{-H}} \quad (4.16)$$

$$K_{MGal} = \frac{k_H + k_T}{k_{Glb}} \quad (4.17)$$

$$E = \frac{E_T}{1 + \frac{Gal}{K_I} + \frac{Lac}{K_M} + \frac{a}{K_{MH}} + \gamma \times \left(1 + \frac{Gal}{K_{MGal}} + \frac{b}{K_{MT}} \right)} \quad (4.18)$$

Em que K_{MH} representa a afinidade da enzima livre para diferentes substratos, K_I representa a constante de equilíbrio para a inibição da enzima livre pela galactose, K_{MT} denota a afinidade do complexo enzima-galactosil pelos diferentes açúcares e K_{MGal} representa a afinidade do complexo enzima-galactosil pela galactose presente na reação. Além disso, K_M representa a formação do complexo $EGal$ e Gli , k_H , k_{-H} , k_T e k_{-T} são as constantes cinéticas de dissociação direta e reversa para as reações de hidrólise e transgalactosilação e k_{Glb} é a constante cinética de dissociação reversa para a formação do complexo enzima-galactosil galactose. Além disso, k_{-Lac} e k_{Lac} são constantes cinéticas de dissociação direta e reversa para a formação do complexo enzima-lactosil. Neste modelo, uma inativação térmica de primeira ordem em relação à enzima (E_T) foi considerada (Eq. 4.10) (ZHOU; CHEN, 2001), no qual k_E é a constante de inativação da enzima. A hipótese subjacente usada neste trabalho é que a perda de atividade (medida pelo método ONPG indireto) afeta igualmente todas as reações, embora seja possível que algumas reações catalíticas sofram mais com esta inativação “global” do que outras. Portanto, para o modelo proposto, o balanço real de resíduos de glicose-galactose é representado na Equação 4.19.

$$\left(\frac{Gli}{Gal} \right) = \frac{Lac + Gli + Tri + Tet}{Lac + Gal + 2 \times Glb + 2 \times Tri + 3 \times Trig + 3 \times Tet + 4 \times Tetg} \quad (4.19)$$

4.2.2.1 Formação de Galactobiose

Conforme discutido anteriormente (item 4.2.1), uma maneira fácil de avaliar a formação de oligossacarídeo composto apenas por resíduos de galactose é através de um pseudo balanço de resíduos de glicose e galactose, conforme definido pela Equação 4.1, ao longo do tempo usando dados experimentais. A Figura 4.7 expressa os resultados para duas condições diferentes para a síntese de GOS usando a $Kl-\beta$ -Gal. Esta figura indica que oligossacarídeos constituídos exclusivamente por galactose devem estar se formando durante a reação, uma vez que, o único sacarídeo alimentado nesta reação foi a lactose. Caso contrário, o resultado da Equação 4.1 deve ser constante e igual a um.

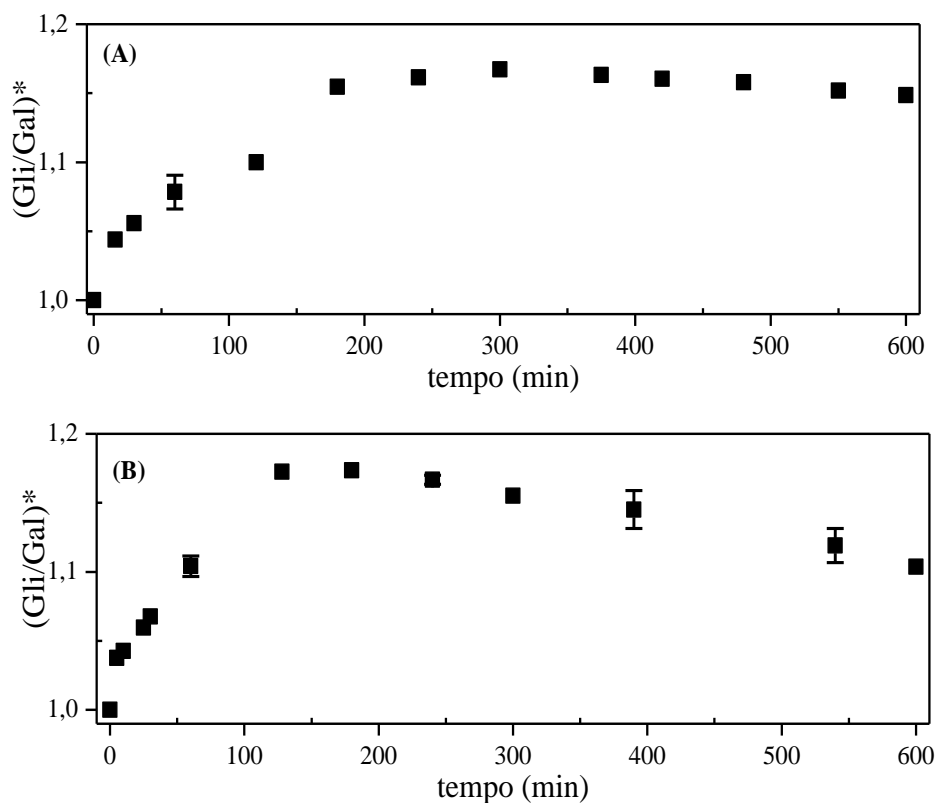


Figura 4.7 - Pseudo balanço de resíduos de glicose e galactose (Gli/Gal)*, Equação 4.1 versus tempo. Concentração da enzima é de $2,42 \times 10^{-7}$ mol/L (E_0). (A) CIL = 0,60 M e $E = E_0$, (B) CIL = 0,64 M e $E = 1,5E_0$. As barras de erro correspondem ao desvio padrão (d.p.) das réplicas de ensaios (2 ou 3).

Fonte: Elaborado pela autora.

4.2.2.2 Ajuste do Modelo Cinético para Síntese de GOS e Estimativa do Conjunto de Parâmetros

Para ajuste do modelo, foram utilizados dados experimentais de galactose, glicose, di, tri e tetrassacarídeo de vários ensaios em batelada. A Figura 4.8 demonstra que o modelo proposto neste trabalho, incluindo ensaios com diferentes cargas enzimáticas iniciais se ajusta bem aos dados experimentais com erro padrão médio de 32 mM.

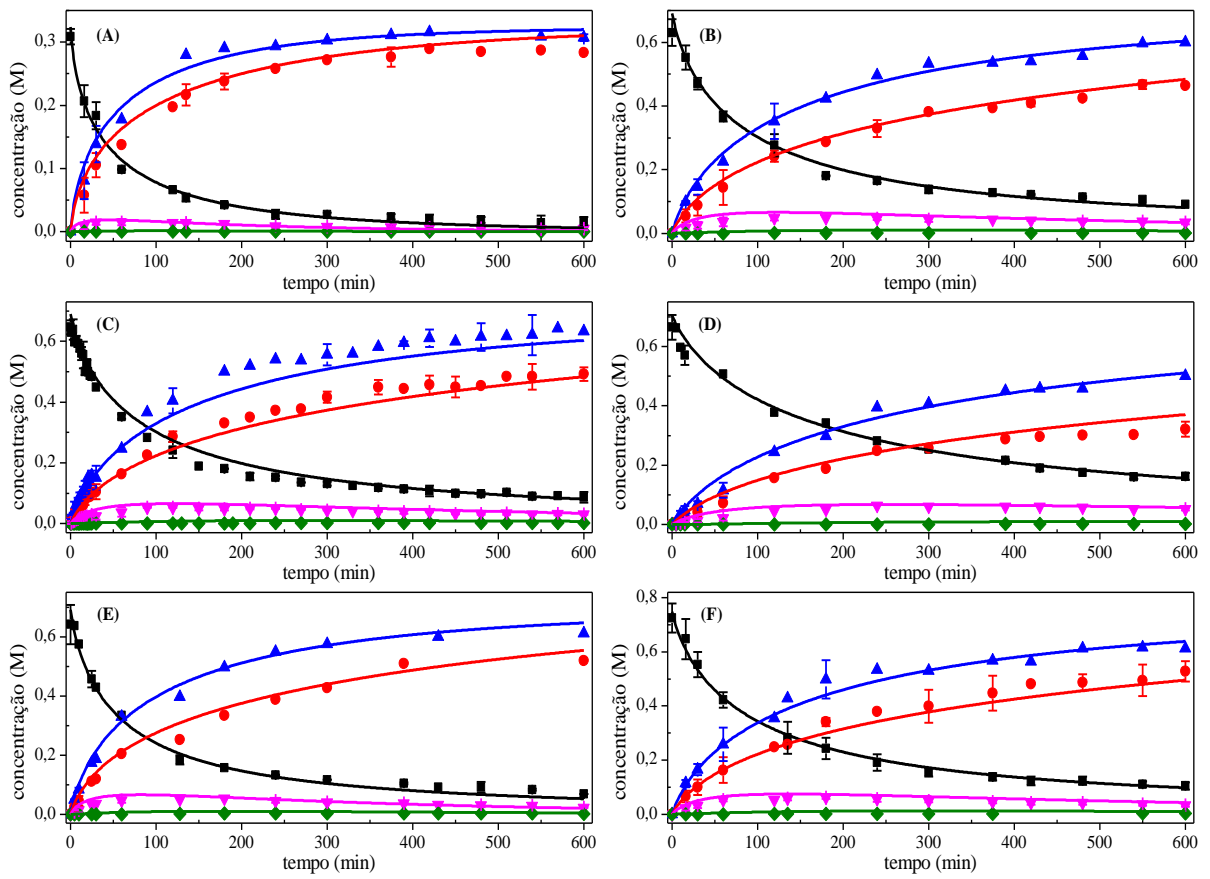


Figura 4.8 - Síntese de GOS usando a *Kl-β-Gal*. Ensaios realizados em tampão fosfato de potássio (50 mM, pH 7), 40 °C. Concentração de enzima usada foi de $2,42 \times 10^{-7}$ mol/L (E0), exceto quando indicado de outra forma. (A) CIL = 0,30 M, (B) CIL = 0,60 M, (C) CIL = 0,64 M, (D) CIL = 0,64 M e E = 0,5E0, (E) CIL = 0,64 M e E = 1,5E0, (F) CIL = 0,70 M. Di = Lac + Glb (■), GOS-3 = Tri + Trig (▼), GOS-4 = Tet + Tetg (◆), Gli (▲) e Gal (●). Os símbolos representam dados experimentais e as linhas sólidas são os ajustes da curva do modelo proposto. As barras de erro correspondem ao d.p. das réplicas de ensaios (2 ou 3).

Fonte: Elaborado pela autora.

A Tabela 4.9 demonstra os parâmetros ajustados usando os resultados apresentados na Figura 4.8. Apesar de esses parâmetros não poderem ser comparados diretamente com aqueles relacionados anteriormente na literatura, a constante de Michaelis obtida para lactose (K_M) aproximadamente 26 mM, está dentro do valor relatado na literatura, que é de 17-34 mM (CAVILLE; COMBES, 1995; CHOCKCHAIWASDEE *et al.*, 2005; KIM; JI; OH, 2003; RICO-DIAZ *et al.*, 2017). A constante cinética de inativação foi ajustada independentemente usando um ensaio de estabilidade térmica e está mostrada na Figura 4.9.

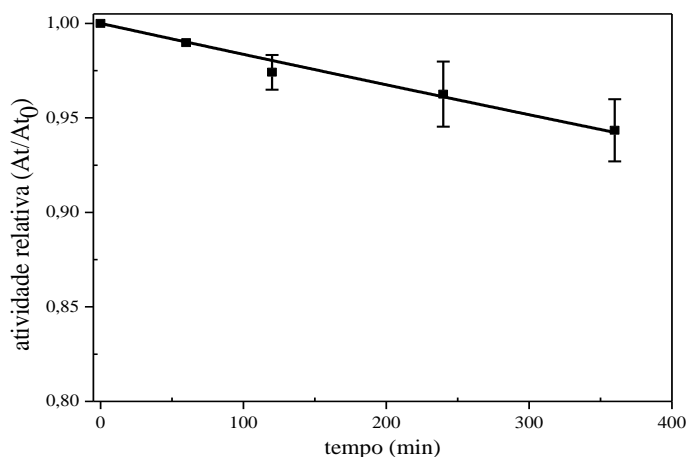


Figura 4.9 - Atividade relativa em função do tempo para a *KI-β-Gal* a 40 °C. A_t é a atividade enzimática ao longo do tempo e A_{t_0} é a atividade enzimática inicial. Os símbolos representam dados experimentais (com barras de erro correspondendo ao desvio padrão de ensaios em triplicata) e a linha sólida o modelo de primeira ordem (Equação 4.10).

Fonte: Elaborado pela autora.

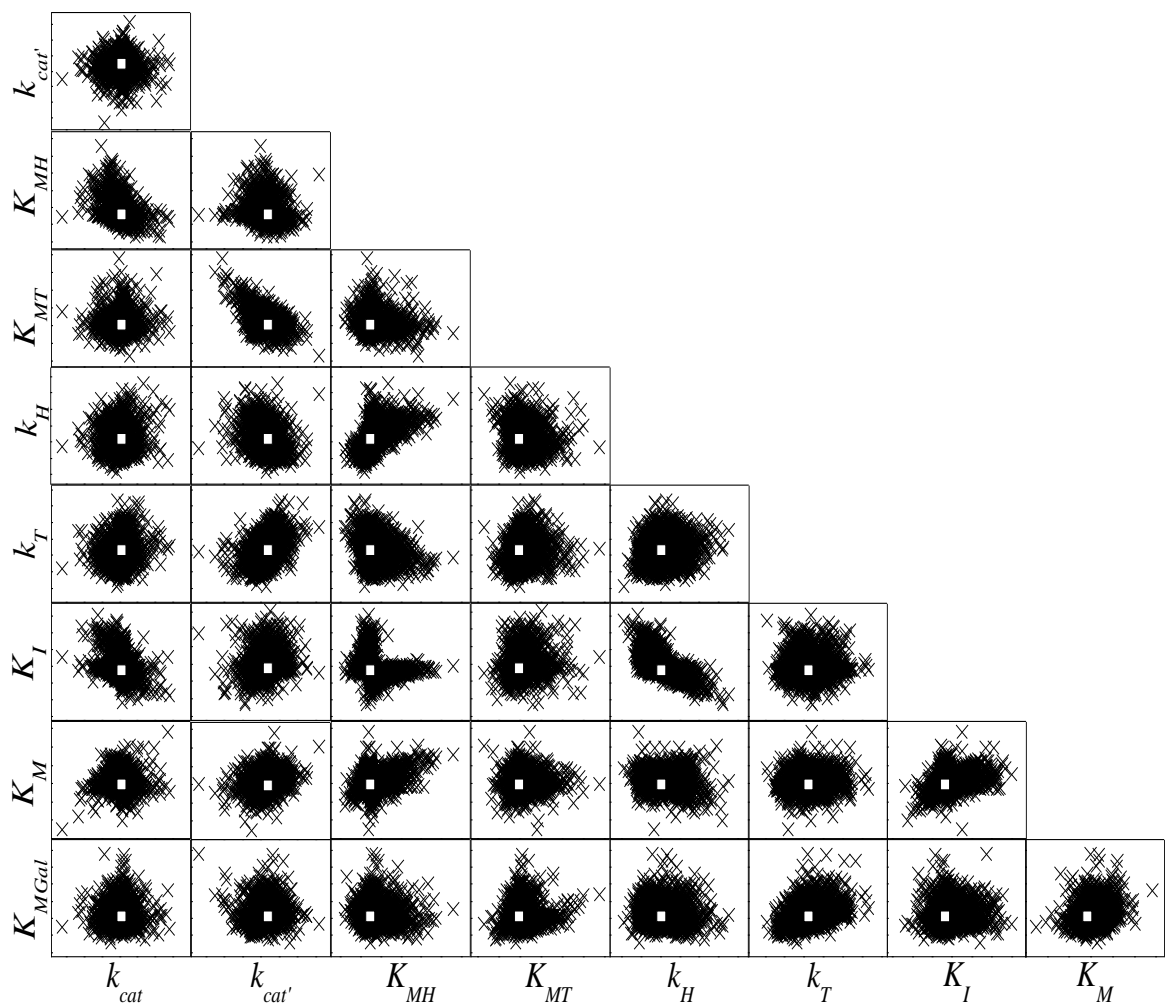
O modelo de primeira ordem foi suficiente para descrever essa inativação (vide Figura 4.9). Com um k_E de $1,651 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}$, a *KI-β-Gal* (Lactozym 3000 L HP G) incubada em condições de reação (tampão de fosfato de potássio 50 mM, pH 7, 40 °C, 10 mM de NaCl e 1,5 mM de MgCl_2) apresentou tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) de 70 h. Vale ressaltar que o uso de sais de sódio e magnésio desempenham um papel importante na estabilidade dessa enzima. Nossos resultados mostram uma diminuição no $t_{1/2}$ para menos de 25 h na ausência desses cofatores (dados não mostrados). Por exemplo, Rodriguez-Colinas *et al.* (2011) avaliaram a termoestabilidade da mesma enzima (Lactozym 3000 L HP G) incubada em tampão Tris-HCl 100 mM, pH 7, a 40 °C resultando em um $t_{1/2}$ de aproximadamente 10 h.

O uso de uma constante de inativação neste modelo ajuda a inferir a alimentação de enzimas em um modo de longa duração ou em batelada alimentada. Também deu melhores resultados de ajuste. No entanto, espera-se que a alta concentração de açúcar no meio de reação aumente a estabilidade da enzima (RODRIGUEZ-COLINAS *et al.*, 2011). Portanto, a velocidade real de inativação durante a reação é incerta e o k_E deve ser usado com cuidado. Os intervalos de confiança dos parâmetros apresentados na Tabela 4.9 foram avaliados utilizando os percentis 2,5 e 97,5 de cada distribuição dos parâmetros obtidos na abordagem de bootstrap, cujos resultados estão representados na Figura 4.10. O intervalo de confiança pode fornecer informações sobre a qualidade da estimativa do parâmetro. Normalmente, quanto mais estreito for o intervalo de confiança, melhor será a estimativa do parâmetro.

Tabela 4.9 - Parâmetros estimados para síntese com a *KI*- β -Gal em pH 7 e 40 °C.

Parâmetros	Valor \pm erro padrão	Intervalo de confiança (95%)
$k_{cat} \times 10^{-7}$ (min ⁻¹)	$3,526 \pm 0,217$	3,041; 3,904
$k_{cat'} \times 10^{-9}$ (min ⁻¹)	$9,943 \pm 0,607$	8,524; 11,013
$K_{MH} \times 10^6$ (mol/L)	$3,345 \pm 0,567$	2,796; 5,106
$K_{MT} \times 10^6$ (mol/L)	$1,758 \pm 0,116$	1,621; 2,088
$k_H \times 10^{-3}$ (min ⁻¹)	$2,876 \pm 0,536$	2,066; 4,080
$k_T \times 10^{-4}$ (min ⁻¹)	$1,439 \pm 0,108$	1,244; 1,682
$K_I \times 10^6$ (mol/L)	$9,405 \pm 1,323$	7,721; 13,391
$K_M \times 10^2$ (mol/L)	$2,586 \pm 0,194$	2,303; 3,055
$K_{MGal} \times 10^6$ (mol/L)	$2,433 \pm 0,249$	2,111; 3,078
$k_E \times 10^4$ (min ⁻¹)	$1,651 \pm 0,087$	1,374; 1,929

Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 4.10 - Conjunto dos parâmetros obtidos pela abordagem de bootstrap. \times Representa os valores da distribuição do parâmetro e \square representa os valores ótimos dos parâmetros.

Fonte: Elaborado pela autora.

Na Figura 4.10 estão apresentadas as distribuições conjuntas 2×2 obtidas após 2000 execuções do algoritmo de bootstrap. Nela, os valores ótimos dos parâmetros resultantes do procedimento de ajuste são representados como quadrados brancos. A partir dessas distribuições, além dos intervalos de confiança, foram avaliadas as matrizes de covariância e

correlação dos parâmetros. Essas matrizes são úteis na avaliação do intervalo de confiança de simulações obtidas usando o resultado do modelo. A matriz de correlação, mostrada na Tabela 4.10 é importante para encontrar uma forte correlação entre os parâmetros.

Tabela 4.10 - Matriz de correlação dos parâmetros estimados apresentados na Tabela 4.9.

k_{cat}	1.00								
$k_{cat'}$	-0.03	1.00							
K_{MH}	-0.41	-0.15	1.00						
K_{MT}	0.01	-0.47	-0.15	1.00					
k_H	0.05	-0.31	0.58	-0.16	1.00				
k_T	0.12	0.44	-0.23	0.12	0.13	1.00			
K_I	-0.35	0.19	-0.27	0.15	-0.68	0.02	1.00		
K_M	0.04	0.29	0.35	0.03	-0.18	0.08	0.39	1.00	
K_{MGal}	0.02	0.11	-0.04	0.05	-0.07	0.38	0.01	0.25	1.00
	k_{cat}	$k_{cat'}$	K_{MH}	K_{MT}	k_H	k_T	K_I	K_M	K_{MGal}

Fonte: Elaborado pela autora.

Quando dois parâmetros estão altamente correlacionados, a mudança em um parâmetro pode compensar a mudança no outro, sem grande mudança no valor da função objetivo (erro entre o modelo e os dados experimentais). A análise dos parâmetros correlacionados pode ajudar a identificar se essa correlação é intrínseca à estrutura do modelo, se é devido à físico-química do sistema ou uma má escolha das condições experimentais (que também está ligada à estrutura matemática do modelo). Os parâmetros mais correlacionados com base na matriz de correlação são K_I e k_H (valores de correlação de -0,68) seguidos por k_H e K_{MH} (0,58) (vide Tabela 4.10). A correlação (valores absolutos) obtida para todos os outros pares foram inferiores a 0,50. A alta correlação obtida para esses parâmetros possivelmente reflete em seu erro padrão relativamente alto.

A correlação entre k_H e K_{MH} é compreensível devido à definição de K_{MH} (Equação 4.15) combinada com o fato de que o valor de k_T era muito menor do que k_H . Isso é esperado uma vez que, em condições de equilíbrio, apenas a glicose e a galactose estão presentes, e a alta seletividade de GOS somente é obtida pelo aumento da concentração de lactose. Por outro lado, a grande correlação negativa obtida e claramente representada na Figura 4.10 para K_I e k_H não é tão fácil de identificar. Essa correlação pode estar ligada a uma dependência não linear claramente observada entre K_I e K_{MH} . Esse comportamento não pode ser previsto usando a matriz de correlação (Tabela 4.10), pois a correlação entre esses dois parâmetros é de apenas -0,27. Isso parece estar relacionado à estrutura do modelo matemático da Equação 4.18, que descreve a concentração da enzima livre. Observe que Gal e a (definido

pela Equação 4.12) aumentam com o tempo em todos os ensaios em batelada. A correlação entre essas duas variáveis pode fazer com que os parâmetros K_I e K_{MH} sejam negativamente dependentes, pois um pode compensar o outro na Equação 4.18. A correlação entre esses parâmetros, entretanto, não prejudicou a estimativa do parâmetro.

Uma característica importante desse modelo é que ele também fornece uma inferência da quantidade de GOS formada exclusivamente a partir da galactose, conforme mostrado nas Figuras 4.11A-D. Para avaliar a confiabilidade do *Glb* predito pelo modelo, algumas suposições são necessárias.

- I) Como inicialmente apenas a lactose estava presente, glicose/galactose deve ser igual a um em todos os momentos;
- II) A concentração experimental de dissacarídeo é a soma da lactose e da galactobiose;
- III) Os tri e tetrassacarídeos compostos exclusivamente por galactose são desprezíveis, como pode ser visto pelos resultados da modelagem mostrado nas Figuras 4.11B e 4.11D.

Usando essas suposições, é possível isolar *Glb* a partir da Equação 4.19. Em seguida, a galactobiose pode ser estimada colocando dados experimentais nesta equação. Os resultados são apresentados na Figura 4.11E e Figura 4.11F.

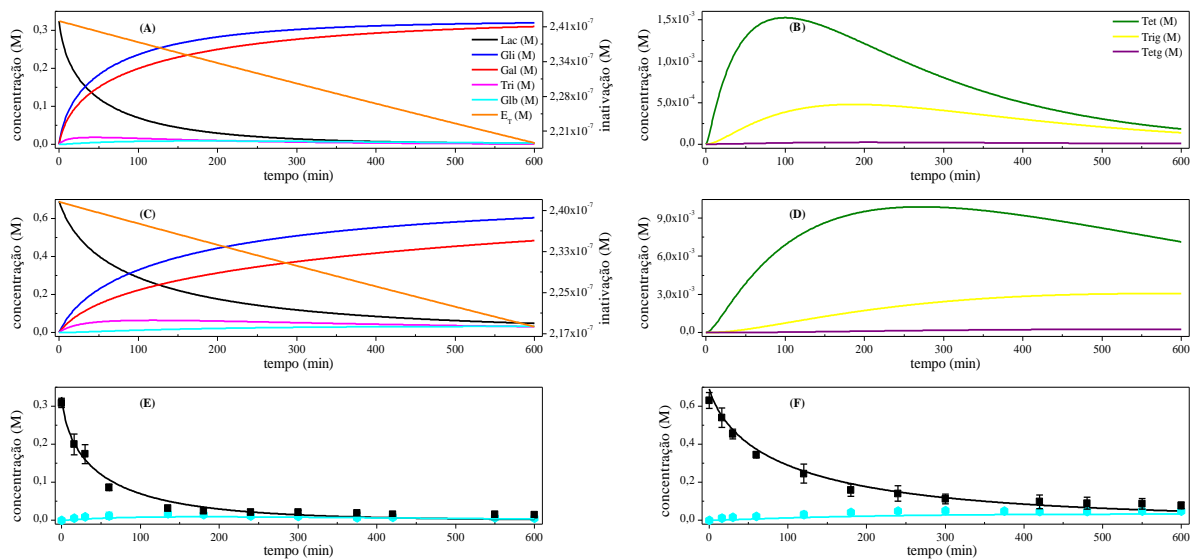


Figura 4.11 - Separação de galacto-oligosacarídeos: (A, B e E) para CIL = 0,30 M, (C, D e F) para CIL = 0,60 M. Símbolos representam *Glb* (●) e *Lac* (■) estimado pelo balanço de *Gli*/*Gal* (em Equação 4.19) por meio de dados experimentais. As barras de erro correspondem ao d.p. de réplicas de ensaios (2 ou 3) e concentração inicial de enzima igual a E_0 . As linhas sólidas são os ajustes da curva do modelo proposto.

Fonte: Elaborado pela autora.

É importante mencionar que os dados representados nas Figuras 4.11E e 4.11F não foram usados para ajustar o modelo. Tanto *Lac* quanto *Glb* são avaliados a partir do modelo e são usados para prever a formação de galactobiose e o consumo de lactose, conforme apresentado na Figura 4.11E e Figura 4.11F. Observe que a previsão da concentração de galactobiose é tão importante quanto à concentração de trissacarídeo, uma vez que eles têm efeito bifidogênico semelhante (LI *et al.*, 2015; RODRIGUEZ-COLINAS *et al.*, 2013; SANZ; GIBSON; RASTALL, 2005) e, para as condições na Figura 4.11, eles apresentam concentrações semelhantes ao final da reação. Ao prever a galactobiose, o modelo fornece informações mais precisas do conteúdo prebiótico durante a síntese. Portanto, a otimização computacional pode ser realizada com base na maximização do conteúdo prebiótico, tomando também como prebiótico *Glb*, além de concentrações de *tri* e de GOS maiores.

É importante esclarecer que a Suposição II não tem nenhum impacto na estimativa de *Glb* a partir dos dados experimentais mostrados nas Figuras 4.11E e 4.11F. No entanto, impacta a inferência de lactose. A lactose experimental apresentada nestas figuras representa todos os dissacarídeos Gal-Gli com qualquer ligação (principalmente lactose e alolactose). Como mencionado anteriormente, a produção de alolactose não foi abordada neste modelo. No entanto, foi realizada uma tentativa de incorporar esta etapa no mecanismo de reação. Os resultados do ajuste não melhoraram o desempenho já obtido sem esta etapa (dados não mostrados) e não é possível validar experimentalmente o perfil de alolactose obtido, mesmo utilizando os balanços de massa dos resíduos. Portanto, foi decidido não incluí-la no estudo atual, pois uma avaliação adicional é necessária.

Com base na Suposição III, um modelo simplificado pode ser usado no qual Trig e Tetg são desprezados. Para isso, as Equações 4.7 e 4.9 podem ser removidas do modelo e Trig e Tetg nas Equações 4.5, 4.12 e 4.13 podem ser assumidas como zero. Observe, entretanto, que o número de parâmetros não é reduzido por esta simplificação. Uma tentativa de reestimar os parâmetros usando esta simplificação não alterou o valor ótimo dos parâmetros (pelo menos dentro da precisão relatada na Tabela 4.9). Este resultado destaca a baixa sensibilidade da função objetivo para esta parte do modelo.

4.2.2.3 Validação de dados experimentais com resultados simulados

Para ajustar os parâmetros cinéticos, apenas as concentrações de lactose abaixo do seu limite de solubilidade foram usadas. Extrapolação com concentrações mais altas foi usada para validar o modelo cinético. Concentrações acima do limite de solubilidade (0,88 M em 40 °C) (ROOS, 2009; SCOTTA; VERA; CONEJEROS, 2016) foram desconsideradas na cinética, embora consideradas no balanço de massa. Na Figura 4.12 estão apresentados os resultados da validação usando diferentes CIL.

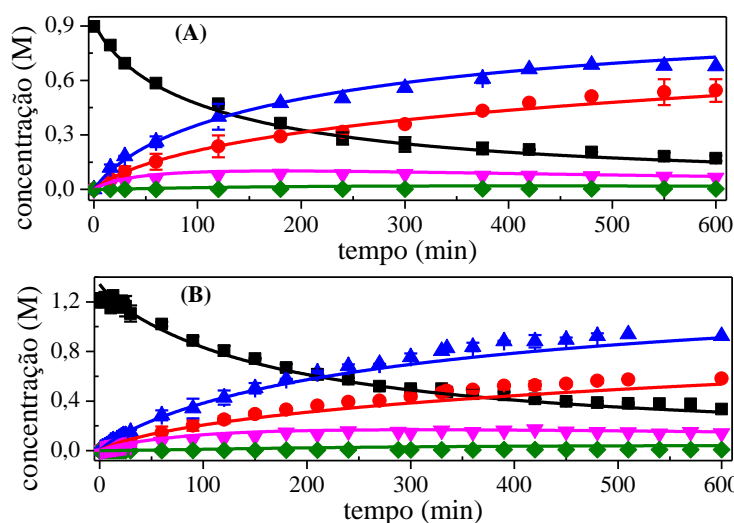


Figura 4.12 - Validação do modelo cinético. (A) CIL = 0,90 M, (B) CIL = 1,20 M. Di = Lac + Glb (■), GOS-3 = Tri + Trig (▼), GOS-4 = Tet + Tetg (◆), Gli (▲) e Gal (●). Os símbolos representam dados experimentais (com d.p. das réplicas de ensaios (2 ou 3)) e as linhas sólidas são os ajustes da curva do modelo proposto.

Fonte: Elaborado pela autora.

A partir da Figura 4.12, fica claro que o modelo caracteriza bem o comportamento do sistema. Portanto, este modelo pode ser usado para prever a síntese de GOS em reatores com altas concentrações de lactose. Isso é importante porque uma alta concentração de lactose é essencial para manter uma alta relação síntese/hidrólise (seletividade).

Embora o modelo tenha sido construído para condições e fonte de enzima específica, é provável que esse modelo possa ser usado para β -galactosidases de outras fontes com especificidades diferentes se um novo conjunto de dados for adquirido e um novo procedimento de estimativa de parâmetro for realizado.

5 CONCLUSÕES

Durante a elaboração deste trabalho foram feitos diversos estudos para entender a síntese enzimática de galacto-oligossacarídeos utilizando como substrato lactose e permeado do soro de leite empregando como catalisador a enzima β -galactosidase livre de *Kluyveromyces lactis*.

O aumento na seletividade se deve à presença do íon sódio. Em suma, a transgalactosilação, que é a reação de formação de GOS, foi favorecida quando foi adicionado separadamente íons de sódio, potássio ou magnésio em comparação à lactose pura. A hidrólise foi maior quando se utilizou lactose pura como substrato. Portanto, os meios de reação sem a presença de sais favorecem tanto a hidrólise da lactose quanto dos oligossacarídeos formados.

A seletividade quando usado o íon sódio na concentração de 51 mM de Na^+ foi maior dentre todos os ensaios apresentados no item 4.1.1.1. Os resultados de velocidades iniciais indicam que a presença de Mg^{2+} ou K^+ , ou ainda, de lactose pura favorecem a velocidade inicial de hidrólise e atividade total. O cálcio inibiu a velocidade inicial de síntese e hidrólise da enzima. O efeito de inibição causado pelo Ca^{2+} tanto na atividade total, atividade de síntese e hidrólise parece ser ativado na presença de K^+ . A inibição da atividade de hidrólise ainda é mais acentuada pelo íon sódio, na presença do íon potássio.

Na literatura, embora existam modelos para a síntese de GOS usando β -galactosidase, eles não caracterizam a presença de galactobiose com sucesso quando lactose é utilizada como substrato. Mesmo os modelos que caracterizam a galactobiose estão sujeitos a erros de balanço de massa ou outros problemas que os impedem de modelar com precisão a síntese enzimática de GOS. O modelo cinético utilizado nesse trabalho corrige muitos desses problemas e permite a estimativa de frações de GOS compostas apenas por resíduos de galactose, o que permite discriminar entre galactobiose, um dissacarídeo com propriedades prebióticas, e lactose. Foi demonstrado que o modelo se ajusta bem aos dados experimentais, evitando overfitting. O modelo possui um pequeno número de parâmetros e foi validado prevendo a produção de GOS com altas concentrações de lactose, condição necessária para alta seletividade sintética. O modelo fornece informações mais precisas sobre o conteúdo prebiótico real durante a reação, permite o uso de ferramentas computacionais para otimizar o conteúdo prebiótico e não apenas as concentrações de tri e tetrassacarídeo.

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Utilizar um método adequado para separar lactose, galactobiose e alolactose, para depois inserir a alolactose no modelo cinético utilizado neste trabalho, para que seja possível fazer sua validação.

Utilizar este modelo para estudos de estado estacionário e dinâmico, incluindo projeto de reator, controle de processo e estimativa de estado.

Ajustar e simular este modelo cinético a batelada alimentada utilizando diversas concentrações de substrato e enzima, e diferentes temperaturas para buscar um processo otimizado.

Aplicar controle ótimo em batelada alimentada para otimizar a alimentação de substrato e enzima.

Utilizar β -galactosidases de outras fontes buscando investigar a seletividade e rendimento na síntese de GOS.

Imobilizar a β -galactosidase de *K. lactis* e de outras fontes para ajustar modelos cinéticos.

Incorporar a influência dos sais presentes no permeado do soro de leite no modelo cinético para simular sua influência sobre as reações de síntese de GOS e hidrólise da lactose.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, L. R. **Tecnologia de leite e derivados**. Textos acadêmicos, Editora UFLA/FAEPE, Lavras-MG, p. 215, 1999.
- AEHLE, W. **Enzymes in industry**. Weinheim, Germany: Wiley-VCH, p. 144, 2004.
- ARSLANOGLU, S.; MORO, G. E.; BOEHM, G. Early Supplementation of Prebiotic Oligosaccharides Protects Formula-Fed Infants against Infections during the First 6 Months of Life. **The Journal of Nutrition**, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jn/137.11.2420>.
- ARSLANOGLU, S.; MORO, G. E.; BOEHM, G.; *et al.* Early neutral prebiotic oligosaccharide supplementation reduces the incidence of some allergic manifestations in the first 5 years of life. **Journal of biological regulators and homeostatic agents**, 2012.
- ARSLANOGLU, S.; MORO, G. E.; SCHMITT, J.; *et al.* Early Dietary Intervention with a Mixture of Prebiotic Oligosaccharides Reduces the Incidence of Allergic Manifestations and Infections during the First Two Years of Life. **The Journal of Nutrition**, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jn/138.6.1091>.
- ASADPOOR, M.; PEETERS, C.; HENRICKS, P. A. J.; *et al.* Anti-pathogenic functions of non-digestible oligosaccharides in vitro. **Nutrients**, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/nu12061789>.
- ATYAKSHEVA, L. F.; PILIPENKO, O. S.; POLTORAK, O. M.; CHUKHRAI, E. S. Effect of magnesium cations on the activity and stability of β -galactosidases. **Russian Journal of Physical Chemistry A**, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1134/S0036024407070266>.
- AZCARATE-PERIL, M. A.; RITTER, A. J.; SAVAIANO, D.; *et al.* Impact of short-chain galactooligosaccharides on the gut microbiome of lactose-intolerant individuals. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 114, n. 3, p. E367-E375, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.1606722113>.
- BAKKEN, A. P.; HILL, C. G.; AMUNDSON, C. H. Hydrolysis of lactose in skim milk by immobilized β -galactosidase (*Bacillus circulans*). **Biotechnology and Bioengineering**, 1992. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/bit.260390407>.
- BARRETEAU, H.; DELATTRE, C.; MICHAUD, P. Production of oligosaccharides as promising new food additive generation. **Food Technology and Biotechnology**, 2006.
- BETSCHART, H. F. **Trägergebundene β -Galactosidase bei der Lactosehydrolyse in Molke unter Berücksichtigung der Oligosaccharide**, 1983. ETH Zürich. Disponível em: <https://doi.org/10.3929/ETHZ-A-000346652>. Acesso em: 28 set. 2020.
- BIELECKA, M.; BIEDRZYCKA, E.; MAJKOWSKA, A.; JUSKIEWICZ, J.; WRÓBLEWSKA, M. Effect of non-digestible oligosaccharides on gut microecosystem in rats. **Food Research International**, 2002. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(01\)00175-2](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(01)00175-2).
- BINDELS, L. B.; DELZENNE, N. M.; CANI, P. D.; WALTER, J. Towards a more comprehensive concept for prebiotics. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 12, n. 5, p. 303-310, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2015.47>.

BOEHM, G.; STAHL, B.; KNOL, J.; GARSSSEN, J. Carbohydrates in Human Milk and Infant Formulas. **Carbohydrate Chemistry, Biology and Medical Applications**, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-054816-6.00012-4>.

BÖGER, M.; VAN LEEUWEN, S. S.; LAMMERTS VAN BUEREN, A.; DIJKHUIZEN, L. Structural identity of galactooligosaccharide molecules selectively utilized by single cultures of probiotic bacterial strains. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b05968>.

BOON, M. A.; JANSSEN, A. E. M.; VAN DER PADT, A. Modelling and parameter estimation of the enzymatic synthesis of oligosaccharides by β -galactosidase from *Bacillus circulans*. **Biotechnology and Bioengineering**, 1999. Disponível em: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19990905\)64:5<558::AID-BIT6>3.0.CO;2-I](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19990905)64:5<558::AID-BIT6>3.0.CO;2-I).

BOON, M. A.; JANSSEN, A. E. M.; VAN'T RIET, K. Effect of temperature and enzyme origin on the enzymatic synthesis of oligosaccharides. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, n. 2-4, p. 271-281, 2000. Disponível em: [https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0141-0229\(99\)00167-2](https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0141-0229(99)00167-2).

BOREWICZ, K.; SUAREZ-DIEZ, M.; HECHLER, C.; *et al.* The effect of prebiotic fortified infant formulas on microbiota composition and dynamics in early life. **Scientific Reports**, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-38268-x>.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, 1976. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).

BRAEGGER, C.; CHMIELEWSKA, A.; DECSI, T.; *et al.* Supplementation of infant formula with probiotics and/or prebiotics: A systematic review and comment by the ESPGHAN committee on nutrition. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/MPG.0b013e3181fb9e80>.

BRUINS, M. E.; STRUBEL, M.; VAN LIESHOUT, J. F. T.; JANSSEN, A. E. M.; BOOM, R. M.. Oligosaccharide synthesis by the hyperthermostable β -glucosidase from *Pyrococcus furiosus*: Kinetics and modelling. **Enzyme and Microbial Technology**, 2003. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(03\)00096-6](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(03)00096-6).

BUCKE, C. Oligosaccharide synthesis using glycosidases. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, 1996. Disponível em: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4660\(199611\)67:3<217::AID-JCTB558>3.0.CO;2-8](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4660(199611)67:3<217::AID-JCTB558>3.0.CO;2-8).

CARDELLE-COBAS, A.; MARTÍNEZ-VILLALUENGA, C.; SANZ, M. L.; MONTILLA, A. Gas chromatographic-mass spectrometric analysis of galactosyl derivatives obtained by the action of two different β -galactosidases. **Food Chemistry**, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.10.057>.

CAVAILLE, D.; COMBES, D. Characterization of β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, 1995.

CHEN, C. W.; OU-YANG, C. C.; YEH, C. W. Synthesis of galactooligosaccharides and transgalactosylation modeling in reverse micelles. **Enzyme and Microbial Technology**, 2003. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(03\)00155-8](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(03)00155-8).

CHEN, X. Y.; GANZLE, M. G. Lactose and lactose-derived oligosaccharides: More than prebiotics? **International Dairy Journal**, v. 67, p. 61-72, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2016.10.001>.

CHOCKCHAIWASDEE, S.; ATHANASOPOULOS, V. I.; NIRANJAN, K.; RASTALL, R. A. Synthesis of galacto-oligosaccharide from lactose using β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*: Studies on batch and continuous UF membrane-fitted bioreactors. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 89, n. 4, p. 434-443, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/bit.20357>.

CORDOVA, A.; ASTUDILLO, C.; VERA, C.; GUERRERO, C.; ILLANES, A. Performance of an ultrafiltration membrane bioreactor (UF-MBR) as a processing strategy for the synthesis of galacto-oligosaccharides at high substrate concentrations. **Journal of Biotechnology**, v. 223, p. 26-35, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.02.028>.

COSTALOS, C.; KAPIKI, A.; APOSTOLOU, M.; PAPATHOMA, E. The effect of a prebiotic supplemented formula on growth and stool microbiology of term infants. **Early Human Development**, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.earlhumdev.2007.03.001>.

COULIER, L.; TIMMERMANS, J.; RICHARD, B.; *et al.* In-depth characterization of prebiotic galactooligosaccharides by a combination of analytical techniques. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jf902549e>.

CRITTENDEN, R. G.; PLAYNE, M. J. Production, properties and applications of food-grade oligosaccharides. **Trends in Food Science and Technology**, 1996. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(96\)10038-8](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(96)10038-8).

CRITTENDEN, R. Prebiotics and probiotics - the importance of branding. **Microbial Ecology in Health & Disease**, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.3402/mehd.v23i0.18566>.

CROUT, D. H. G.; VIC, G. Glycosidases and glycosyl transferases in glycoside and oligosaccharide synthesis. **Current Opinion in Chemical Biology**, 1998. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S1367-5931\(98\)80041-0](https://doi.org/10.1016/S1367-5931(98)80041-0).

CUI, F.; WAN, C.; LI, Y.; LIU, Z.; RAJASHEKARA, G. Co-production of Lactic Acid and *Lactobacillus rhamnosus* Cells from Whey Permeate with Nutrient Supplements. **Food and Bioprocess Technology**, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11947-010-0426-1>.

CUMMINGS, J. H.; MACFARLANE, G. T. Role of intestinal bacteria in nutrient metabolism. **Clinical Nutrition**, 1997. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0261-5614\(97\)80252-X](https://doi.org/10.1016/S0261-5614(97)80252-X).

CUMMINGS, J. H.; ROBERFROID, M. B.; ANDERSSON, H.; *et al.* A new look at dietary carbohydrate: Chemistry, physiology and health. **European Journal of Clinical Nutrition**, 1997. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1600427>.

DELZENNE, N. M.; ROBERFROID, M. R. Physiological effects of non-digestible oligosaccharides. **LWT - Food Science and Technology**, 1994. Disponível em: <https://doi.org/10.1006/fstl.1994.1001>.

DEVI, L. S.; SINGH, D.; CHANDRA, R. Development , chemical analysis and sensory evaluation of whey based pineapple juice beverages. **International Journal of Food Science and Nutrition**, v. 2, n. 5, p. 102-105, 2017.

FAO/WHO. **Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria**. 2001.

FISCHER, C.; KLEINSCHMIDT, T. Synthesis of galactooligosaccharides using sweet and acid whey as a substrate. **International Dairy Journal**, v. 48, p. 15-22, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2015.01.003>.

FISCHER, C.; KLEINSCHMIDT, T. Synthesis of Galactooligosaccharides in Milk and Whey: A Review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12344>.

FLORES, M. V.; ERTOLA, R. J.; VOGET, C. E. Effect of monovalent cations on the stability and activity of *Kluyveromyces lactis* β -galactosidase. **LWT - Food Science and Technology**, 1996. Disponível em: <https://doi.org/10.1006/fstl.1996.0077>.

FONG, W.; LI, Q.; YU, J. Gut microbiota modulation: a novel strategy for prevention and treatment of colorectal cancer. **Oncogene**, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41388-020-1341-1>.

FOOD CHEMICALS CODEX. **Food Chemicals Codex**. 5. ed. Washington, DC: The National Academies Press, 2003. ISBN 0-309-08866-6. Disponível em: <https://doi.org/10.17226/10731>.

FRENZEL, M.; ZERGE, K.; CLAWIN-RAEDECKER, I.; LORENZEN, P. C. Comparison of the galacto-oligosaccharide forming activity of different beta-galactosidases. **LWT - Food Science and Technology**, v. 60, n. 2, p. 1068-1071, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.10.064>.

FULLER, R. A Review 2983/0 Probiotics in man and animals. **Journal of Applied Bacteriology**, 1989.

FÜREDER, V.; RODRIGUEZ-COLINAS, B.; CERVANTES, F. V.; *et al.* Selective Synthesis of Galactooligosaccharides Containing $\beta(1\rightarrow3)$ Linkages with β -Galactosidase from *Bifidobacterium bifidum* (Saphera). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c00997>.

GEKAS, V.; LOPEZ-LEIVA, M. Hydrolysis of lactose : a litterature review. **Process Biochemistry**, 1985.

GIBSON, G. R.; HUTKINS, R.; SANDERS, M. E.; *et al.* The International Scientific Association and Scope of Prebiotics. **Nature Reviews: Gastroenterology and Hepatology**, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2017.75>.

GIBSON, G. R.; PROBERT, H. M.; LOO, J. VAN; RASTALL, R. A.; ROBERFROID, M. B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. **Nutrition Research Reviews**, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1079/nrr200479>.

GIBSON, G. R.; ROBERFROID, M. B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics. **Journal of Nutrition**, 1995. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jn/125.6.1401>.

GIBSON, G. R.; SCOTT, K. P.; RASTALL, R. A.; *et al.* Dietary prebiotics: current status and new definition. **Food Science & Technology Bulletin: Functional Foods**, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1616/1476-2137.15880>.

GIOVANNINI, M.; VERDUCI, E.; GREGORI, D.; *et al.* Prebiotic Effect of an Infant Formula Supplemented with Galacto-Oligosaccharides: Randomized Multicenter Trial. **Journal of the American College of Nutrition**, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/07315724.2013.878232>.

GOLOWCZYC, M.; VERA, C.; SANTOS, M.; *et al.* Use of whey permeate containing in situ synthesised galacto-oligosaccharides for the growth and preservation of *Lactobacillus plantarum*. **Journal of Dairy Research**, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/S0022029913000356>.

GONZÁLEZ SISO, M. I. The biotechnological utilization of cheese whey: A review. **Bioresource Technology**, 1996. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0960-8524\(96\)00036-3](https://doi.org/10.1016/0960-8524(96)00036-3).

GOSLING, A.; STEVENS, G. W.; BARBER, A. R.; KENTISH, S. E.; GRAS, S. L. 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. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jf104397w>.

GOSLING, A.; STEVENS, G. W.; BARBER, A. R.; KENTISH, S. E.; GRAS, S. L. Recent advances refining galactooligosaccharide production from lactose. **Food Chemistry**, v. 121, n. 2, p. 307-318, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.12.063>.

GUARNER, F.; SCHAAFSMA, G. J. Probiotics. **International Journal of Food Microbiology**, 1998. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(97\)00136-0](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(97)00136-0).

GUERRERO, C.; VERA, C.; PLOU, F.; ILLANES, A. Influence of reaction conditions on the selectivity of the synthesis of lactulose with microbial β -galactosidases. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2011.06.007>.

HAVENAAR, R.; HUIS IN'T VELD, J. H. J. Probiotics: A General View. **The Lactic Acid Bacteria**, 1992. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-1-4615-3522-5_6.

HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ, O.; CALVILLO, I.; LEBRÓN-AGUILAR, R.; MORENO, F. J.; SANZ, M. L. Hydrophilic interaction liquid chromatography coupled to mass spectrometry for the characterization of prebiotic galactooligosaccharides. **Journal of Chromatography A**, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.11.047>.

HILL, C.; GUARNER, F.; REID, G.; *et al.* Expert consensus document: The international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.66>.

HOLZAPFEL, W. H.; HABERER, P.; SNEL, J.; SCHILLINGER, U.; HUIS IN'T VELD, J. H. J. Overview of gut flora and probiotics. **International Journal of Food Microbiology**, 1998. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(98\)00044-0](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(98)00044-0).

HUANG, J.; ZHU, S.; ZHAO, L.; *et al.* A novel β -galactosidase from *Klebsiella oxytoca* ZJUH1705 for efficient production of galacto-oligosaccharides from lactose. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10679-9>.

HUBER, R. E.; KURZ, G.; WALLENFELS, K. A Quantitation of the Factors Which Affect the Hydrolase and Transgalactosylase Activities of β -Galactosidase (*E. coli*) on Lactose. **Biochemistry**, 1976. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/bi00654a029>.

HUET, F.; ABRAHAMSE-BERKEVELD, M.; TIMS, S.; *et al.* Partly Fermented Infant Formulae With Specific Oligosaccharides Support Adequate Infant Growth and Are Well-Tolerated. **Journal of pediatric gastroenterology and nutrition**, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/MPG.0000000000001360>.

HUH, K. T.; TOBA, T.; ADACHI, S. Oligosaccharide structures formed during acid hydrolysis of lactose. **Food Chemistry**, 1991. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0308-8146\(91\)90083-Z](https://doi.org/10.1016/0308-8146(91)90083-Z).

HUME, M. P.; NICOLUCCI, A. C.; REIMER, R. A. Prebiotic supplementation improves appetite control in children with overweight and obesity: A randomized controlled trial. **American Journal of Clinical Nutrition**, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3945/ajcn.116.140947>.

ILLANES, A.; VERA, C.; WILSON, L. Enzymatic production of galacto-oligosaccharides. **Lactose-Derived Prebiotics: A Process Perspective**, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802724-0.00004-4>.

INTANON, M.; ARREOLA, S. L.; PHAM, N. H.; *et al.* Nature and biosynthesis of galacto-oligosaccharides related to oligosaccharides in human breast milk. **FEMS Microbiology Letters**, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12407>.

IRKIN, R. Natural Fermented Beverages. **Natural Beverages**, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-816689-5.00014-6>.

ISOLAURI, E.; SALMINEN, S.; OUWEHAND, A. C. Probiotics. **Best Practice and Research: Clinical Gastroenterology**, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bpg.2003.10.006>.

IWASAKI, K. I.; NAKAJIMA, M.; NAKAO, S. I. Galacto-oligosaccharide production from lactose by an enzymic batch reaction using β -galactosidase. **Process Biochemistry**, 1996. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0032-9592\(94\)00067-0](https://doi.org/10.1016/0032-9592(94)00067-0).

JENAB, E.; OMIDGHANE, M.; MUSSONE, P.; *et al.* Enzymatic conversion of lactose into galacto-oligosaccharides: The effect of process parameters, kinetics, foam architecture, and product characterization. **Journal of Food Engineering**, v. 222, p. 63-72, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.11.015>.

- JOSHI, M.; SEIDEL-MORGENSTERN, A.; KREMLING, A. Exploiting the bootstrap method for quantifying parameter confidence intervals in dynamical systems. **Metabolic Engineering**, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2006.04.003>.
- JURADO, E.; CAMACHO, F.; LUZÓN, G.; VICARIA, J. M. Kinetic models of activity for β -galactosidases: Influence of pH, ionic concentration and temperature. **Enzyme and Microbial Technology**, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2003.07.004>.
- KAREB, O.; AİDER, M. Whey and its Derivatives for Probiotics, Prebiotics, Synbiotics, and Functional Foods: a Critical Review. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12602-018-9427-6>.
- KIM, C. S.; JI, E. S.; OH, D. K. A new kinetic model of recombinant β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* for both hydrolysis and transgalactosylation reactions. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.02.118>.
- KIM, C. S.; JI, E. S.; OH, D. K. Expression and characterization of *Kluyveromyces lactis* β -galactosidase in *Escherichia coli*. **Biotechnology Letters**, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1023/A:1026092029785>.
- KIM, S. H.; LIM, K. P.; KIM, H. S. Differences in the Hydrolysis of Lactose and Other Substrates by β -D-Galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. **Journal of Dairy Science**, 1997. Disponível em: [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(97\)76175-7](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(97)76175-7).
- KREWINKEL, M.; GOSCH, M.; RENTSCHLER, E.; FISCHER, L. Epilactose production by 2 cellobiose 2-epimerases in natural milk. **Journal of Dairy Science**, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.3168/jds.2013-7389>.
- LADERO, M.; SANTOS, A.; GARCIA-OCHOA, F. Kinetic modeling of lactose hydrolysis with an immobilized β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, n. 8, p. 583-592, 2000.
- LEE, Y. J.; KIM, C. S.; OH, D. K. Lactulose production by β -galactosidase in permeabilized cells of *Kluyveromyces lactis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00253-003-1506-1>.
- LI, W.; WANG, K.; SUN, Y.; *et al.* Influences of structures of galactooligosaccharides and fructooligosaccharides on the fermentation in vitro by human intestinal microbiota. **Journal of Functional Foods**, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.12.044>.
- LIEBECQ, C. IUPAC-IUBMB joint commission on biochemical nomenclature (JCBN) and nomenclature committee of IUBMB (NC-IUBMB). Newsletter, 1996. **Glycoconjugate Journal**, 1998. Disponível em: <https://doi.org/10.1023/A:1017122612620>.
- LIEPINS, J.; CIPROVICA, I.; ZOLNERE, K. The impact of calcium ions on commercially available β -galactosidase. **Anais [...]**, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.22616/foodbalt.2017.017>.
- LILLY, D. M.; STILLWELL, R. H. Probiotics: Growth-promoting factors produced by microorganisms. **Science**, 1965. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/science.147.3659.747>.

LISBOA, C. R. **Síntese enzimática de galactooligosacarídeos a partir de lactose e soro de leite**. Dissertação [Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos] - Universidade Federal do Rio Grande; 2008.

LOO, J. V.; CUMMINGS, J.; DELZENNE, N.; *et al.* Functional food properties of non-digestible oligosaccharides: a consensus report from the ENDO project (DGXII AIRII-CT94-1095). **British Journal of Nutrition**, 1999. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/s0007114599000252>.

LU, L.; GUO, L.; WANG, K.; LIU, Y.; XIAO, M. β -Galactosidases: A great tool for synthesizing galactose-containing carbohydrates. **Biotechnology Advances**, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.107465>.

MACFARLANE, G. T.; STEED, H.; MACFARLANE, S. Bacterial metabolism and health-related effects of galacto-oligosaccharides and other prebiotics. **Journal of Applied Microbiology**, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03520.x>.

MAHONEY, R. R. Galactosyl-oligosaccharide formation during lactose hydrolysis: A review. **Food Chemistry**, 1998. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(98\)00020-X](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(98)00020-X).

MANNING, T. S.; GIBSON, G. R. Prebiotics. **Best Practice and Research: Clinical Gastroenterology**, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bpg.2003.10.008>.

MANO, M. C. R.; NERI-NUMA, I. A.; DA SILVA, J. B.; *et al.* Oligosaccharide biotechnology: an approach of prebiotic revolution on the industry. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, n. 1, p. 17-37, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8564-2>.

MANUCCI, F. **Enzymatic synthesis of galactooligosaccharides from whey permeate**. 184f. Thesis - Dublin Institute of Technology, 2009.

MARKOWIAK, P.; ŚLIZEWSKA, K. Effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on human health. **Nutrients**, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/nu9091021>.

MARTINEZ-VILLALUENGA, C.; CARDELLE-COBAS, A.; CORZO, N.; LANO, A.; VILLAMIEL, M. Optimization of conditions for galactooligosaccharide synthesis during lactose hydrolysis by beta-galactosidase from *Kluyveromyces lactis* (Lactozym 3000 L HP G). **Food Chemistry**, v. 107, n. 1, p. 258–264, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.08.011>.

MARTINS, A. R.; LISBÔA C. R. Mathematical Model for the Conversion of Lactose and Synthesis of Galacto-Oligosaccharides (GOS) with Simultaneous Reversible Inhibition by Glucose and Galactose. **International Journal of Engineering Research & Technology**, v. 4, n. 4, p. 299-305, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.17577/ijertv4is040511>.

MEHRA, R.; KELLY, P. Milk oligosaccharides: Structural and technological aspects. **International Dairy Journal**, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2006.06.008>.

METCHNIKOFF, É. Lactic acid as inhibiting intestinal putrefaction. **The Prolongation of Life: Optimistic Studies**, 1907.

- MIQDADY, M.; MISTARIHI, J. A.; AZAZ, A.; RAWAT, D. Prebiotics in the infant microbiome: The past, present, and future. **Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition**, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.5223/pghn.2020.23.1.1>.
- MISSELWITZ, B.; BUTTER, M.; VERBEKE, K.; FOX, M. R. Update on lactose malabsorption and intolerance: Pathogenesis, diagnosis and clinical management. **Gut**, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2019-318404>.
- MONTILLA, A.; CORZO, N.; OLANO, A. Effects of monovalent cations (Na⁺ and K⁺) on galacto-oligosaccharides production during lactose hydrolysis by *Kluyveromyces lactis* β -galactosidase. **Milchwissenschaft**, 2012.
- MOZAFFAR, Z.; NAKANISHI, K.; MATSUNO, R. Formation of Oligosaccharides During Hydrolysis of Lactose in Milk Using β -Galactosidase from *Bacillus circulans*. **Journal of Food Science**, 1985. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1985.tb10543.x>.
- MUSSATTO, S. I.; MANCILHA, I. M. Non-digestible oligosaccharides: A review. **Carbohydrate Polymers**, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2006.12.011>.
- NAKANISHI, K.; MATSUNO, R.; TORII, K.; YAMAMOTO, K.; KAMIKUBO, T. Properties of immobilized β -d-galactosidase from *Bacillus circulans*. **Enzyme and Microbial Technology**, 1983. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(83\)90044-3](https://doi.org/10.1016/0141-0229(83)90044-3).
- NESSMITH, W. B.; NELSEN, J. L.; TOKACH, M. D.; GOODBAND, R. D.; BERGSTRÖM, J. R. Effects of substituting deproteinized whey and(or) crystalline lactose for dried whey on weanling pig performance. **Journal of Animal Science**, 1997. Disponível em: <https://doi.org/10.2527/1997.75123222x>.
- NIVETHA, A.; MOHANASRINIVASAN, V. Mini review on role of β -galactosidase in lactose intolerance. **IOP Conference Series: Materials Science and Engineering**, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1088/1757-899X/263/2/022046>.
- OLVEIRA, G.; GONZÁLEZ-MOLERO, I. Actualización de probióticos, prebióticos y simbióticos en nutrición clínica. **Endocrinología y Nutrición**, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.endonu.2016.07.006>.
- OTIENO, Daniel Obed. Synthesis of β -Galactooligosaccharides from Lactose Using Microbial β -Galactosidases. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, [s. l.], 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2010.00121.x>
- PAGANINI, D.; UYOGA, M. A.; CERCAMONDI, C. I.; *et al* . Consumption of galacto-oligosaccharides increases iron absorption from a micronutrient powder containing ferrous fumarate and sodium iron EDTA: A stable-isotope study in Kenyan infants. **American Journal of Clinical Nutrition**, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3945/ajcn.116.145060>.
- PALAI, T.; BHATTACHARYA, P. K. Kinetics of lactose conversion to galacto-oligosaccharides by beta-galactosidase immobilized on PVDF membrane. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 115, n. 6, p. 668-673, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2012.12.014>.

PALFRAMAN, R.; GIBSON, G. R.; RASTALL, R. A. Development of a quantitative tool for the comparison of the prebiotic effect of dietary oligosaccharides. **Letters in Applied Microbiology**, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.2003.01398.x>.

PEREIRA-RODRIGUEZ, A.; FERNANDEZ-LEIRO, R.; GONZALEZ-SISO, M. I.; *et al.* Structural basis of specificity in tetrameric *Kluyveromyces lactis* beta-galactosidase. **Journal of Structural Biology**, v. 177, n. 2, p. 392-401, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2011.11.031>.

PRENOSIL, J. E.; STUKER, E.; BOURNE, J. R. Formation of oligosaccharides during enzymatic lactose: Part I: State of art. **Biotechnology and Bioengineering**, 1987. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/bit.260300904>.

RICO-DIAZ, A.; ALVAREZ-CAO, M. E.; ESCUDER-RODRIGUEZ, J. J.; *et al.* Rational mutagenesis by engineering disulphide bonds improves *Kluyveromyces lactis* beta-galactosidase for high-temperature industrial applications. **Scientific Reports**, v. 7, p. 1-11, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/srep45535>.

RIVERO-URGELL, M.; SANTAMARIA-ORLEANS, A. Oligosaccharides: Application in infant food. **Early Human Development**, 2001. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0378-3782\(01\)00202-X](https://doi.org/10.1016/S0378-3782(01)00202-X).

ROBERFROID, M.; GIBSON, G. R.; HOYLES, L.; *et al.* Prebiotic effects: Metabolic and health benefits. **British Journal of Nutrition**, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/S0007114510003363>.

ROBERFROID, M.; SLAVIN, J. Nondigestible Oligosaccharides. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/10408690091189239>.

ROCHA-MENDOZA, D.; KOSMERL, E.; KRENTZ, A.; *et al.* Invited review: Acid whey trends and health benefits. **Journal of Dairy Science**, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3168/jds.2020-19038>.

RODRIGUEZ-COLINAS, B.; DE ABREU, M. A.; FERNANDEZ-ARROJO, L.; *et al.* Production of galacto-oligosaccharides by the β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*: Comparative analysis of permeabilized cells versus soluble enzyme. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jf2022012>.

RODRIGUEZ-COLINAS, B.; FERNANDEZ-ARROJO, L.; BALLESTEROS, A. O.; PLOU, F. J. Galactooligosaccharides formation during enzymatic hydrolysis of lactose: Towards a prebiotic-enriched milk. **Food Chemistry**, v. 145, p. 388-394, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.08.060>.

RODRIGUEZ-COLINAS, B.; FERNANDEZ-ARROJO, L.; SANTOS-MORIANO, P.; BALLESTEROS, A. O.; PLOU, F. J. Continuous packed bed reactor with immobilized β -galactosidase for production of galactooligosaccharides (GOS). **Catalysts**, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/catal6120189>.

RODRIGUEZ-COLINAS, B.; KOLIDA, S.; BARAN, M.; *et al.* Analysis of fermentation selectivity of purified galacto-oligosaccharides by in vitro human faecal fermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00253-013-4892-z>.

RODRIGUEZ-FERNANDEZ, M.; CARDELLE-COBAS, A.; VILLAMIEL, M.; BANGA, J. R. Detailed kinetic model describing new oligosaccharides synthesis using different β -galactosidases. **Journal of Biotechnology**, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2011.03.012>.

ROOS, Y. H. Solid and liquid states of lactose. **ADVANCED DAIRY CHEMISTRY**, 2009. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-0-387-84865-5_2.

SÁEZ-LARA, M. J.; ROBLES-SANCHEZ, C.; RUIZ-OJEDA, F. J.; PLAZA-DIAZ, J.; GIL, A. Effects of probiotics and synbiotics on obesity, insulin resistance syndrome, type 2 diabetes and non-alcoholic fatty liver disease: A review of human clinical trials. **International Journal of Molecular Sciences**, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms17060928>.

SAKO, T.; MATSUMOTO, K.; TANAKA, R. Recent progress on research and applications of non-digestible galacto-oligosaccharides. **International Dairy Journal**, 1999. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(99\)00046-1](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(99)00046-1).

SANZ, M. L.; GIBSON, G. R.; RASTALL, R. A. Influence of disaccharide structure on prebiotic selectivity in vitro. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jf050276w>.

SCHULTZ, G. **Análise e modelagem da síntese enzimática de galacto-oligosacarídeos**. 98f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2016.

SCHULTZ, G.; ALEXANDER, R.; LIMA, F. V.; GIORDANO, R. C.; RIBEIRO, M. P. A. Kinetic modeling of the enzymatic synthesis of galacto-oligosaccharides: Describing galactobiose formation. **Food and Bioproducts Processing**, v. 127, p. 1-13, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2021.02.004>.

SCHUSTER-WOLFF-BÜHRING, R.; MICHEL, R.; HINRICHS, J. A new liquid chromatography method for the simultaneous and sensitive quantification of lactose and lactulose in milk. **Dairy Science and Technology**, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1051/dst/2010034>.

SCOTTA, F.; VERA, C.; CONEJEROS, R. Technical and economic analysis of industrial production of lactose-derived prebiotics with focus on galacto-oligosaccharides. **Lactose-Derived Prebiotics**, p. 261-284, 2016. Elsevier. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-802724-0.00007-x>.

SHEPHERD, S. J.; LOMER, M. C.E.; GIBSON, P. R. Short-chain carbohydrates and functional gastrointestinal disorders. **American Journal of Gastroenterology**, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/ajg.2013.96>.

SIERRA, C.; BERNAL, M. J.; BLASCO, J.; *et al.* Prebiotic effect during the first year of life in healthy infants fed formula containing GOS as the only prebiotic: a multicentre, randomised, double-blind and placebo-controlled trial. **European Journal of Nutrition**, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00394-014-0689-9>.

SILVA, K.; BOLINI, H. M. A.; ANTUNES, A. J. Soro de Leite Bovino em Sorvete. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 15, n. 2, p. 187-196, 2004.

- SKÓRKA, A.; PIEŚCIK-LECH, M.; KOŁODZIEJ, M.; SZAJEWSKA, H. Infant formulae supplemented with prebiotics: Are they better than unsupplemented formulae? An updated systematic review. **British Journal of Nutrition**, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/S0007114518000120>.
- SPOHNER, S. C.; SCHAUM, V.; QUITMANN, H.; CZERMAK, P. *Kluyveromyces lactis*: an emerging tool in biotechnology. **Journal of Biotechnology**, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.02.023>.
- STORHAUG, C. L.; FOSSE, S. K.; FADNES, L. T. Country, regional, and global estimates for lactose malabsorption in adults: a systematic review and meta-analysis. **The Lancet Gastroenterology and Hepatology**, 2017. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S2468-1253\(17\)30154-1](https://doi.org/10.1016/S2468-1253(17)30154-1).
- THONGARAM, T.; HOEFLINGER, J. L.; CHOW, J.; MILLER, M. J. Prebiotic Galactooligosaccharide Metabolism by Probiotic Lactobacilli and Bifidobacteria. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 65, n. 20, p. 4184-4192, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b00851>.
- TISSIER, H. **Traitement des infections intestinales par la methode de transformation de la flore bacterienne de l'intestin**. 1906, 11 p.
- TORRES, D. P. M.; GONÇALVES, M. P.; TEIXEIRA, J. A.; RODRIGUES, L. R. Galacto-Oligosaccharides: Production, Properties, Applications, and Significance as Prebiotics. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 9, n. 5, p. 438-454, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2010.00119.x>.
- TZORTZIS, G.; VULEVIC, J. Galacto-Oligosaccharide Prebiotics. **Prebiotics and Probiotics Science and Technology**, 2009. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-0-387-79058-9_7.
- URRUTIA, P.; RODRIGUEZ-COLINAS, B.; FERNANDEZ-ARROJO, L.; *et al.* Detailed analysis of galactooligosaccharides synthesis with β -galactosidase from *Aspergillus oryzae*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jf304354u>.
- VEEREMAN-WAUTERS, G.; STAELENS, S.; VAN DE BROEK, H.; *et al.* Physiological and bifidogenic effects of prebiotic supplements in infant formulae. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/MPG.0b013e3182139f39>.
- VERA, C.; CÓRDOVA, A.; ABURTO, C.; *et al.* Synthesis and purification of galactooligosaccharides: state of the art. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11274-016-2159-4>.
- VERA, C.; GUERRERO, C.; CONEJEROS, R.; ILLANES, A. Synthesis of galactooligosaccharides by β -galactosidase from *Aspergillus oryzae* using partially dissolved and supersaturated solution of lactose. **Enzyme and Microbial Technology**, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2011.12.003>.
- VERA, C.; GUERRERO, C.; ILLANES, A.; CONEJEROS, R. A pseudo steady-state model for galactooligosaccharides synthesis with β -galactosidase from *Aspergillus oryzae*.

Biotechnology and Bioengineering, v. 108, n. 10, p. 2270-2279, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/bit.23201>.

VERKHNYATSKAYA, S.; FERRARI, M.; DE VOS, P.; WALVOORT, M. T. C. Shaping the infant microbiome with non-digestible carbohydrates. **Frontiers in Microbiology**, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00343>.

VICTORA, C. G.; BAHL, R.; BARROS, A. J. D.; *et al.* Breastfeeding in the 21st century: Epidemiology, mechanisms, and lifelong effect. **The Lancet**, 2016. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)01024-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)01024-7).

VOGET, C. E.; FLORES, M. V.; FALOCI, M. M.; ERTOLA, R. J. J. Effects of the ionic environment on the stability of *Kluyveromyces lactis* β -galactosidase. **LWT - Food Science and Technology**, 1994. Disponível em: <https://doi.org/10.1006/fstl.1994.1067>.

VORAGEN, A. G. J. Technological aspects of functional food-related carbohydrates. **Trends in Food Science and Technology**, 1998. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(98\)00059-4](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(98)00059-4).

VULEVIC, J.; DRAKOULARAKOU, A.; YAQOUB, P.; TZORTZIS, G.; GIBSON, G. R. Modulation of the fecal microflora profile and immune function by a novel trans-galactooligosaccharide mixture (B-GOS) in healthy elderly volunteers. **American Journal of Clinical Nutrition**, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.3945/ajcn.2008.26242>.

VULEVIC, J.; JURIC, A.; WALTON, G. E.; *et al.* Influence of galacto-oligosaccharide mixture (B-GOS) on gut microbiota, immune parameters and metabolomics in elderly persons. **British Journal of Nutrition**, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/S0007114515001889>.

VULEVIC, J.; TZORTZIS, G.; JURIC, A.; GIBSON, G. R. Effect of a prebiotic galactooligosaccharide mixture (B-GOS®) on gastrointestinal symptoms in adults selected from a general population who suffer with bloating, abdominal pain, or flatulence. **Neurogastroenterology and Motility**, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/nmo.13440>.

WHISNER, C. M.; MARTIN, B. R.; SCHOTERMAN, M. H. C.; *et al.* Galacto-oligosaccharides increase calcium absorption and gut bifidobacteria in young girls: A double-blind cross-over trial. **British Journal of Nutrition**, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/S000711451300055X>.

WILLIAMS, N. C.; JOHNSON, M. A.; SHAW, D. E.; *et al.* A prebiotic galactooligosaccharide mixture reduces severity of hyperpnoea-induced bronchoconstriction and markers of airway inflammation. **British Journal of Nutrition**, v. 116, n. 5, p. 798-804, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/S0007114516002762>.

WIT, J. N. **Lecturer's handbook on whey and whey products**. Brussels: European Whey Products Association, 2001.

WONG, N. P.; LACROIX, D. E.; MCDONOUGH, F. E. Minerals in Whey and Whey Fractions. **Journal of Dairy Science**, 1978. Disponível em: [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(78\)83790-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(78)83790-4).

YAÑEZ-ÑECO, C. V.; RODRIGUEZ-COLINAS, B.; AMAYA-DELGADO, L.; *et al.* Galactooligosaccharide production from *Pantoea anthophila* strains isolated from “Tejuino”, a

Mexican traditional fermented beverage. **Catalysts**, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/catal7080242>.

YANG, S. T. **Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable Resources**. 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52114-9.X5000-2>.

YIN, H.; BULTEMA, J. B.; DIJKHUIZEN, L.; VAN LEEUWEN, S. S. Reaction kinetics and galactooligosaccharide product profiles of the beta-galactosidases from *Bacillus circulans*, *Kluyveromyces lactis* and *Aspergillus oryzae*. **Food Chemistry**, v. 225, p. 230-238, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.01.030>.

YOU, S.; ZHANG, J.; YIN, Q.; *et al.* Development of a novel integrated process for co-production of B-galactosidase and ethanol using lactose as substrate. **Bioresource Technology**, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.01.019>.

ZHOU, Q. Z. K.; CHEN, X. D. Effects of temperature and pH on the catalytic activity of the immobilized β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. **Biochemical Engineering Journal**, 2001. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S1369-703X\(01\)00118-8](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(01)00118-8).

ZHU, F.; PROSSER, C.; ZHU, Y.; OTTER, D.; HEMAR, Y. Enzymatic formation of galactooligosaccharides in goat milk. **Food Bioscience**, v. 26, p. 38-41, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2018.09.005>.

ZIEMER, C. J.; GIBSON, G. R. An overview of probiotics, prebiotics and synbiotics in the functional food concept: Perspectives and future strategies. **International Dairy Journal**, 1998. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(98\)00071-5](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(98)00071-5).

APÊNDICE A - ENSAIOS DE VELOCIDADES INICIAIS

Condições	$r_{GOS} \pm d.p.$ (M/min)	$r_{Gal} \pm d.p.$ (M/min)	$(r_{GOS} + r_{Gal}) \pm d.p.$ (M/min)	$(r_{GOS}/r_{Gal}) \pm d.p.$
lactose	$1,422 \times 10^{-3} \pm 1,708 \times 10^{-4}$	$4,875 \times 10^{-3} \pm 7,050 \times 10^{-4}$	$6,297 \times 10^{-3} \pm 8,758 \times 10^{-4}$	$2,923 \times 10^{-1} \pm 7,226 \times 10^{-3}$
permeado	$6,401 \times 10^{-4} \pm 3,016 \times 10^{-4}$	$2,010 \times 10^{-3} \pm 6,792 \times 10^{-4}$	$2,650 \times 10^{-3} \pm 9,809 \times 10^{-4}$	$3,108 \times 10^{-1} \pm 4,502 \times 10^{-2}$
37 mM Ca ²⁺ 12 mM Mg ²⁺	$6,136 \times 10^{-4} \pm 7,930 \times 10^{-5}$	$1,791 \times 10^{-3} \pm 2,680 \times 10^{-4}$	$2,404 \times 10^{-3} \pm 3,473 \times 10^{-4}$	$3,432 \times 10^{-1} \pm 7,078 \times 10^{-3}$
37 mM Ca ²⁺ 36 mM Mg ²⁺	$5,692 \times 10^{-4} \pm 1,138 \times 10^{-4}$	$1,737 \times 10^{-3} \pm 3,162 \times 10^{-4}$	$2,307 \times 10^{-3} \pm 4,299 \times 10^{-4}$	$3,271 \times 10^{-1} \pm 5,954 \times 10^{-3}$
37 mM Ca ²⁺ 48 mM Mg ²⁺	$6,939 \times 10^{-4} \pm 1,113 \times 10^{-4}$	$2,180 \times 10^{-3} \pm 3,365 \times 10^{-4}$	$2,874 \times 10^{-3} \pm 4,478 \times 10^{-4}$	$3,181 \times 10^{-1} \pm 1,939 \times 10^{-3}$
12 mM Ca ²⁺ 12 mM Mg ²⁺	$8,122 \times 10^{-4} \pm 1,268 \times 10^{-4}$	$2,429 \times 10^{-3} \pm 3,526 \times 10^{-4}$	$3,242 \times 10^{-3} \pm 4,794 \times 10^{-4}$	$3,341 \times 10^{-1} \pm 3,695 \times 10^{-3}$
5 mM Ca ²⁺ 12 mM Mg ²⁺	$7,785 \times 10^{-4} \pm 7,441 \times 10^{-5}$	$2,344 \times 10^{-3} \pm 2,739 \times 10^{-4}$	$3,123 \times 10^{-3} \pm 3,483 \times 10^{-4}$	$3,325 \times 10^{-1} \pm 7,105 \times 10^{-3}$
51 mM Na ⁺	$6,675 \times 10^{-4} \pm 2,151 \times 10^{-4}$	$1,571 \times 10^{-3} \pm 6,050 \times 10^{-4}$	$2,239 \times 10^{-3} \pm 8,201 \times 10^{-4}$	$4,304 \times 10^{-1} \pm 2,881 \times 10^{-2}$
12 mM Mg ²⁺	$1,032 \times 10^{-3} \pm 2,295 \times 10^{-4}$	$3,205 \times 10^{-3} \pm 8,192 \times 10^{-4}$	$4,238 \times 10^{-3} \pm 1,049 \times 10^{-3}$	$3,235 \times 10^{-1} \pm 1,110 \times 10^{-2}$
6,7 mM K ⁺	$1,160 \times 10^{-3} \pm 2,206 \times 10^{-4}$	$3,623 \times 10^{-3} \pm 5,358 \times 10^{-4}$	$4,782 \times 10^{-3} \pm 7,564 \times 10^{-4}$	$3,191 \times 10^{-1} \pm 1,370 \times 10^{-2}$
37 mM Ca ²⁺	$2,305 \times 10^{-4} \pm$ n.d.	$6,476 \times 10^{-4} \pm$ n.d.	$8,781 \times 10^{-4} \pm$ n.d.	$3,559 \times 10^{-1} \pm$ n.d.
51 mM Na ⁺ 37 mM Ca ²⁺ 12 mM Mg ²⁺ 6,7 mM K ⁺	$5,183 \times 10^{-4} \pm 1,109 \times 10^{-4}$	$1,445 \times 10^{-3} \pm 2,880 \times 10^{-4}$	$1,963 \times 10^{-3} \pm 3,989 \times 10^{-4}$	$3,582 \times 10^{-1} \pm 5,340 \times 10^{-3}$
51 mM Na ⁺ 37 mM Ca ²⁺	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
51 mM Na ⁺ 6,7 mM K ⁺	$5,828 \times 10^{-4} \pm$ n.d.	$1,532 \times 10^{-3} \pm$ n.d.	$2,115 \times 10^{-3} \pm$ n.d.	$3,804 \times 10^{-1} \pm$ n.d.
51 mM Na ⁺ 12 mM Mg ²⁺	$6,002 \times 10^{-4} \pm$ n.d.	$1,586 \times 10^{-3} \pm$ n.d.	$2,187 \times 10^{-3} \pm$ n.d.	$3,783 \times 10^{-1} \pm$ n.d.
12 mM Mg ²⁺ 6,7 mM K ⁺	$7,248 \times 10^{-4} \pm$ n.d.	$2,429 \times 10^{-3} \pm$ n.d.	$3,154 \times 10^{-3} \pm$ n.d.	$2,984 \times 10^{-1} \pm$ n.d.
37 mM Ca ²⁺ 6,7 mM K ⁺	$1,333 \times 10^{-4} \pm$ n.d.	$5,392 \times 10^{-4} \pm$ n.d.	$6,726 \times 10^{-4} \pm$ n.d.	$2,473 \times 10^{-1} \pm$ n.d.
5% Gal em lactose 274 g/L	$4,248 \times 10^{-4} \pm 9,817 \times 10^{-6}$	$2,560 \times 10^{-3} \pm 9,278 \times 10^{-4}$	$2,985 \times 10^{-3} \pm 9,376 \times 10^{-4}$	$1,768 \times 10^{-1} \pm 6,024 \times 10^{-2}$
permeado 274 g/L	$5,886 \times 10^{-4} \pm$ n.d.	$1,658 \times 10^{-3} \pm$ n.d.	$2,247 \times 10^{-3} \pm$ n.d.	$3,549 \times 10^{-1} \pm$ n.d.
lactose 274 g/L	$6,494 \times 10^{-4} \pm$ n.d.	$2,191 \times 10^{-3} \pm$ n.d.	$2,840 \times 10^{-3} \pm$ n.d.	$2,964 \times 10^{-1} \pm$ n.d.

Desvio padrão (d.p.) não determinado (n.d.). Todos os ensaios foram realizados em 40 °C com concentração de enzima de 5,8 U/mL, CIL = 220 g/L, em tampão fosfato de potássio (pH 7 e 50 mM), contendo 10 mM de NaCl e 1,5 mM de MgCl₂, exceto nos experimentos mencionados com CIL diferente.