

## Síntese de galacto-oligossacarídeos a partir de lactose usando $\beta$ -galactosidase comercial de *Kluyveromyces lactis*

*Synthesis of galactooligosaccharides from lactose using commercial  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces lactis**

### Autores | Authors

#### **Cristiane Reinaldo LISBOA**

Universidade Federal do Rio Grande  
(FURG)  
Escola de Química e Alimentos (EQA)  
Laboratório de Engenharia de  
Bioprocessos  
Rio Grande/RS - Brasil  
e-mail: cricalisboa@yahoo.com.br

#### **Fátima Aparecida de Almeida COSTA**

Universidade Estadual de Campinas  
(UNICAMP)  
Faculdade de Engenharia de Alimentos  
Laboratório de Engenharia de  
Bioprocessos  
Campinas/SP - Brasil  
e-mail: fifa@fea.unicamp.br

#### **Janaína Fernandes de Medeiros BURKERT**

Universidade Federal do Rio Grande  
(FURG)  
Escola de Química e Alimentos (EQA)  
Laboratório de Engenharia de  
Bioprocessos  
Rio Grande/RS - Brasil  
e-mail: jfmb@vetorial.net

#### ✉ **Carlos André Veiga BURKERT**

Universidade Federal do Rio Grande  
(FURG)  
Escola de Química e Alimentos (EQA)  
Laboratório de Engenharia de Bioprocessos  
Rua Engenheiro Alfredo Huch, 475  
Caixa Postal: 474  
CEP: 96201-900  
Rio Grande/RS - Brasil  
e-mail: burkert@vetorial.net

### Resumo

O objetivo deste trabalho foi estudar a influência de parâmetros reacionais na obtenção via enzimática de galacto-oligossacarídeos (GOS), utilizando-se a enzima comercial  $\beta$ -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* (Lactozym® 3000 L), tendo como substrato a lactose. Foi proposto um planejamento experimental  $2^3$ , verificando a influência da temperatura (30 a 40 °C), da concentração de lactose (200 a 400 mg.mL<sup>-1</sup>) e da concentração de enzima (5 a 10 U.mL<sup>-1</sup>) no desempenho da reação enzimática. Os ensaios foram conduzidos a 180 rpm e pH 7,0 (tampão fosfato de sódio 0,1 M). A enzima Lactozym® 3000 L apresentou atividade de transgalactosilação, tendo sido atingido rendimento do processo igual a 41,9% e concentração de GOS de 167,5 mg.mL<sup>-1</sup> no sistema reacional composto por 400 mg.mL<sup>-1</sup> de lactose e 5 U.mL<sup>-1</sup> de enzima a 30 °C em 14 h de reação. Nessa condição, a conversão de lactose foi de 65,0%. Maior concentração de lactose foi favorável ao mecanismo de transgalactosilação, enquanto que, em menores concentrações, o mecanismo hidrolítico predominou.

**Palavras-chave:** Prebióticos; Oligossacarídeos; Transgalactosilação.

### Summary

The main goal of this work was to study the influence of the reaction parameters on the enzymatic production of galactooligosaccharides (GOS) using the commercial  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* (Lactozym® 3000 L) and lactose as the substrate. A  $2^3$  experimental design was proposed, verifying the influence of the temperature (30 to 40 °C), lactose concentration (200 to 400 mg.mL<sup>-1</sup>) and enzyme concentration (5 to 10 U.mL<sup>-1</sup>) on the performance of the enzymatic reaction. The assays were carried out at 180 rpm and pH 7.0 (0.1 M sodium phosphate buffer). The enzyme Lactozym® 3000 L presented transgalactosylation activity, reaching a yield of 41.9% and GOS concentration of 167.5 mg.mL<sup>-1</sup> in a reaction system composed of 400 mg.mL<sup>-1</sup> of lactose and 5 U.mL<sup>-1</sup> of enzyme at 30 °C and 14 h of reaction. Under these conditions the lactose conversion was 65.0%. Higher lactose concentrations favored the transgalactosylation mechanism, whereas the hydrolytic mechanism dominated with lower concentrations.

**Key words:** Prebiotics; Oligosaccharides; Transgalactosylation.

✉ Autor Correspondente | Corresponding Author

Recebido | Received: 29/06/2009

Aprovado | Approved: 04/08/2011

Publicado | Published: mar./2012

## Síntese de galacto-oligossacarídeos a partir de lactose usando $\beta$ -galactosidase comercial de *Kluyveromyces lactis*

LISBOA, C. R. et al.

### 1 Introdução

Oligossacarídeos são definidos como glicosídeos que contêm de 3 a 10 unidades de monossacarídeos, sendo encontrados como componentes naturais de muitos alimentos, incluindo frutas, vegetais, leite e mel. São considerados ingredientes funcionais, pois, além das modificações que promovem no *flavor* e nas características físico-químicas dos alimentos em que são incorporados, exibem atividade fisiológica, pois sua ingestão traz benefícios à saúde humana (PAZUR, 1970; VAN LOO et al., 1999).

Galacto-oligossacarídeos (GOS) são carboidratos formados por até 7 unidades de galactose e uma glicose terminal (TZORTZIS e VULEVIC, 2009); são resistentes à ação das enzimas digestivas e, portanto, não digeríveis (MORO et al., 2005). Ao serem consumidos, produzem um significativo incremento, principalmente na população de *Bifidobacterium*, com a conseqüente redução da concentração de bactérias putrefativas; os galacto-oligossacarídeos são, dessa forma, considerados prebióticos (BOUHNİK et al., 1997). Os efeitos benéficos ao trato gastrointestinal vão desde a modulação do sistema imune, por meio das propriedades antiadesivas que indicam possíveis reduções nos riscos de câncer no cólon (SHOAF et al., 2006), passam por vantagens digestivas, como a regulação no trânsito intestinal (TEURI e KORPELA, 1998), e atingem ganhos nutricionais, como a absorção de minerais desejáveis, em especial cálcio e magnésio (CHONAN et al., 1995). Os GOS, quando comparados aos fruto-oligossacarídeos, são mais estáveis quando submetidos a tratamentos térmicos, mesmo sob condições ácidas (SAKO et al., 1999). Por não serem digeridos, apresentam baixo valor calórico; por não serem metabolizados por micro-organismos da cavidade oral, não são cariogênicos (HARTEMINK et al., 1997). Há um grande interesse no seu uso em formulações infantis, em função da presença de oligossacarídeos com estruturas similares no leite materno (ANTHONY et al., 2006).

A  $\beta$ -galactosidase ou  $\beta$ -D-galactosídeo-galactohidrolase (EC 3.2.1.23) é classificada como uma hidrolase, em geral associada à hidrólise da lactose do leite na produção de lácteos de baixo teor de lactose para pessoas intolerantes a esse carboidrato (WHITAKER, 1972). Um mecanismo geral da ação da  $\beta$ -galactosidase foi proposto por Wallenfels e Malhotra (1962), envolvendo um mínimo de três etapas:

Enzima + Lactose  $\rightarrow$  Enzima-Lactose (1)

Enzima-Lactose  $\rightarrow$  Galactosil-Enzima + Glicose (2)

Galactosil-Enzima + Aceptor  $\rightarrow$   
 $\rightarrow$  Galactosil-Aceptor + Enzima (3)

O mecanismo sugerido envolve a ação de um grupo tiol atuando como uma base e um grupo imidazol atuando como um nucleófilo, que facilita o rompimento da ligação glicosídica (WALLENFELS e MALHOTRA, 1962).

A  $\beta$ -galactosidase catalisa ambas as reações de hidrólise e transgalactosilação, ou seja, a enzima transfere a unidade de galactose para um aceptor que contenha um grupo hidroxila. Na hidrólise, em que a água atua como aceptor, glicose e galactose são formadas. Entretanto, a lactose presente na solução pode também servir como aceptor e, então, GOS são formados pela reação de transgalactosilação. Também alolactose pode ser produzida por transferência interna direta da unidade de galactose da posição 4 para a posição 6 da unidade de glicose presente na molécula de lactose. Os GOS podem atuar como aceptores intermediários, eventualmente formando oligossacarídeos de maior cadeia ou podem tornar-se substrato para a enzima e serem lentamente hidrolisados (HUBER et al., 1976). A reação de transgalactosilação é menos efetiva quanto maior o peso molecular do oligossacarídeo aceptor, o que explicaria a maior formação de di, tri e tetrassacarídeos em comparação com oligômeros maiores, sendo que as  $\beta$ -galactosidases de *Kluyveromyces* produzem principalmente trissacarídeos (BOON et al., 2000).

A hidrólise da ligação glicosídica, de fato, constitui uma reação de transgalactosilação em que o aceptor é a água (BOON et al., 2000). Do ponto de vista da reação de transgalactosilação, a água pode ser considerada como um fator desfavorável à síntese de GOS quando uma grande quantidade de água está presente no meio reacional. Esse efeito pode ser minimizado incrementando-se a concentração de lactose em sistemas aquosos ou conduzindo a reação em meios não aquosos (CHEN et al., 2001).

A formação de GOS a partir da lactose é influenciada por diversos fatores, como a fonte da enzima, a concentração da enzima, a temperatura, o pH e a concentração do substrato (BOON et al., 2000; CARDELLE-COBAS et al., 2008). O planejamento fatorial tem se constituído em poderosa ferramenta para o planejamento e a análise de experimentos em sistemas dependentes de mais de uma variável. As variáveis são modificadas simultaneamente de uma maneira sistemática e os resultados são avaliados estatisticamente (RODRIGUES e IEMMA, 2005). No entanto, na literatura, predomina a análise univariável dos fatores que influenciam a produção de GOS a partir da lactose utilizando-se  $\beta$ -galactosidase de diferentes micro-organismos, como *Bifidobacterium longum* (HSU et al., 2007), *Lactobacillus reuteri* (SPLECHTNA et al., 2006; SPLECHTNA et al., 2007), *Kluyveromyces lactis* (CHOCKCHASAWASDEE et al., 2005), *Talaromyces thermophilus* (NAKKHARAT et al.,

## Síntese de galacto-oligosacarídeos a partir de lactose usando $\beta$ -galactosidase comercial de *Kluyveromyces lactis*

LISBOA, C. R. et al.

2006), *Thermus aquaticus* (BERGER et al., 1997) e *Thermus* sp. (AKIYAMA et al., 2001).

O objetivo deste trabalho foi estudar a influência de parâmetros reacionais na obtenção de GOS a partir da lactose utilizando-se a enzima comercial  $\beta$ -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* (Lactozym® 3000 L). Neste estudo, foi aplicada a metodologia do planejamento experimental.

## 2 Material e métodos

### 2.1 Material

A enzima utilizada foi a  $\beta$ -galactosidase comercial de *Kluyveromyces lactis* Lactozym® 3000 L (Novozymes, Dinamarca), com grau alimentar. A atividade enzimática foi determinada usando-se o método baseado na hidrólise de o-nitrofenol- $\beta$ -galactopiranosídeo a 37 °C por 15 min, seguida de leitura em espectrofotômetro a 425 nm (INCHAURRONDO et al., 1994). Uma unidade de atividade de  $\beta$ -galactosidase foi definida como a que causa a liberação de 1  $\mu$ mol de o-nitrofenol por minuto, nas condições do ensaio.

### 2.2 Síntese de GOS

As reações de síntese enzimática de GOS com a enzima  $\beta$ -galactosidase foram realizadas em meio aquoso. O sistema de reação foi composto por lactose pura dissolvida em tampão fosfato de sódio 0,1 M (pH 7,0) e enzima, totalizando 125 mL, adicionados em Erlenmeyers de 250 mL. As quantidades adicionadas foram estabelecidas de forma a resultar nas concentrações de lactose e enzima, conforme o planejamento experimental proposto. Os frascos foram dispostos em incubadora rotatória, mantidos à temperatura constante conforme estabelecido no planejamento experimental e a agitação foi de 180 rpm para todos os experimentos.

Foram retiradas alíquotas de 5 mL em intervalos de tempo pré-determinados, deixando em banho a 100 °C por 5 min para a inativação da enzima. A concentração de glicose foi imediatamente determinada utilizando-se um kit enzimático colorimétrico Glicose PAP Likuiform (Labtest, Brasil), com leitura da absorbância a 505 nm e conversão à concentração de glicose por curva de calibração previamente estabelecida. A reação foi interrompida após três valores constantes. As amostras foram congeladas e, posteriormente, os açúcares foram quantificados por cromatografia líquida de alta eficiência.

### 2.3 Planejamento fatorial

Um planejamento fatorial  $2^3$  com 3 repetições no ponto central foi proposto a fim de estudar a influência da temperatura, da concentração da enzima e da concentração de lactose na produção de GOS,

obtendo-se como respostas os valores máximos para concentração de GOS e rendimento em cada ensaio. No respectivo tempo de reação, também foram determinadas produtividade, conversão de lactose e razão entre GOS produzido e enzima utilizada no processo (GOS/E). As variáveis independentes em níveis reais e codificados estão apresentadas na Tabela 1. O intervalo de temperatura adotado considerou o perfil de temperatura típico de  $\beta$ -galactosidase proveniente de levedura (MATIOLI et al., 2001). O intervalo para a concentração da enzima foi estabelecido em ensaios preliminares (dados não mostrados), em que se procurou atingir uma taxa de reação apropriada que não implicasse em um tempo de reação demasiado longo. O intervalo de concentração de lactose levou em consideração valores que favorecem a reação de transgalactosilação para diferentes  $\beta$ -galactosidas, conforme citado por Boon et al. (2000), Chen et al. (2001), Splechtna et al. (2006) e Hsu et al. (2007).

O rendimento em GOS e a conversão de lactose foram calculados de acordo com as Equações 1 e 2, propostas por Hsu et al. (2007), enquanto a produtividade foi definida de acordo com a Equação 3 e a razão GOS/E foi calculada conforme sugerido por Cruz et al. (1999), com a Equação 4.

$$\text{Rendimento (\%)} = \frac{\text{GOS}_t}{\text{Gli}_t + \text{Gal}_t + \text{Lac}_t + \text{GOS}_t} \times 100 \quad (1)$$

$$\text{Conversão de Lactose (\%)} = \frac{\text{Lac}_i - \text{Lac}_t}{\text{Lac}_i} \times 100 \quad (2)$$

$$\text{Produtividade (mg.mL}^{-1}\text{.h}^{-1}\text{)} = \frac{\text{GOS}_t - \text{GOS}_i}{t} \quad (3)$$

$$\text{GOS/E (mg.U}^{-1}\text{)} = \frac{\text{GOS}}{C_E} \quad (4)$$

**Tabela 1.** Matriz do planejamento experimental  $2^3$  com valores reais e codificados (entre parênteses).

Ensaio	Temperatura (°C)	Concentração de enzima (U.mL <sup>-1</sup> )	Concentração de lactose (mg.mL <sup>-1</sup> )
1	30 (-1)	5 (-1)	200 (-1)
2	40 (+1)	5 (-1)	200 (-1)
3	30 (-1)	10 (+1)	200 (-1)
4	40 (+1)	10 (+1)	200 (-1)
5	30 (-1)	5 (-1)	400 (+1)
6	40 (+1)	5 (-1)	400 (+1)
7	30 (-1)	10 (+1)	400 (+1)
8	40 (+1)	10 (+1)	400 (+1)
9	35 (0)	7,5 (0)	300 (0)
10	35 (0)	7,5 (0)	300 (0)
11	35 (0)	7,5 (0)	300 (0)

## Síntese de galacto-oligosacarídeos a partir de lactose usando $\beta$ -galactosidase comercial de *Kluyveromyces lactis*

LISBOA, C. R. et al.

As abreviações GOS, Gli, Gal e Lac são, respectivamente, as concentrações de GOS, glicose, galactose e lactose, em mg.mL<sup>-1</sup>; os índices *i* e *t* referem-se à concentração inicial e àquelas atingidas no tempo *t* (correspondente ao tempo de reação para atingir a máxima concentração de GOS em h), respectivamente, e  $C_E$  é a concentração de enzima (U.mL<sup>-1</sup>).

Os dados obtidos foram tratados no software Statistica 5.0, de acordo com Rodrigues e Lemma (2005), para verificação de efeitos principais das variáveis independentes sobre as respostas avaliadas.

### 2.4 Quantificação dos carboidratos por cromatografia de íons (HPLC-PAD)

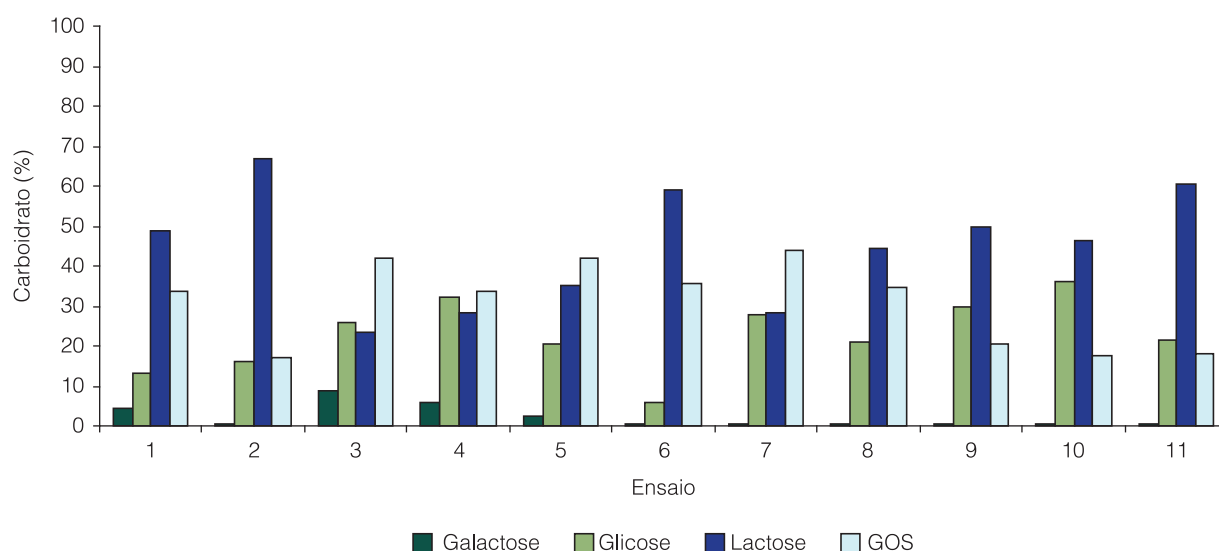
As amostras (25  $\mu$ L) foram filtradas em membranas Millipore de 0,45  $\mu$ m e injetadas no sistema Dionex DX-500 (Sunnyvale, Estados Unidos), que consiste de uma bomba gradiente GP-50 com um detector eletroquímico ED-40, operando na forma de pulso amperométrico, e um eletrodo de trabalho de ouro e um eletrodo de referência Ag-AgCl. Os produtos foram analisados usando uma coluna de troca aniônica CarboPac PA1 (250 x 4 mm) e uma pré-coluna CarboPac PA1, conforme Lisboa (2008). A temperatura foi mantida a 20-22 °C e o fluxo de eluente foi de 1,0 mL.min<sup>-1</sup>. O gradiente de eluição utilizado foi constituído de três solventes: a) uma solução de NaOH 150 mM; b) uma solução de NaOH 150 mM contendo 500 mM de acetato de sódio e c) água Milli-Q. A eluição iniciou-se com 5% de A e 95% de C por 12 min, seguida de um gradiente linear de 100-90% do solvente A combinado com o solvente B por 23 min. Em seguida, a coluna foi lavada por 5 min com 50% de B e 50% de C, e equilibrada com 5% de A e 95% de C por 15 min.

A quantificação foi realizada utilizando-se curva de calibração com os padrões lactose, glicose e galactose na faixa de 1 a 100 mg.L<sup>-1</sup>. Os GOS foram quantificados considerando-se a área relativa dos picos. Para tal, foi utilizado o software de aquisição de dados Peak Net 5.1.

## 3 Resultados e discussão

### 3.1 Síntese enzimática de GOS

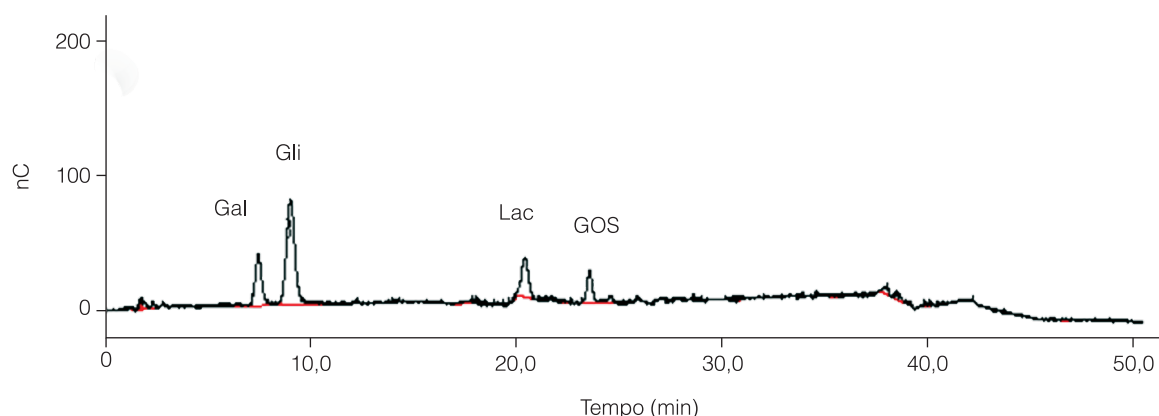
Os resultados referentes aos percentuais de galactose, glicose, lactose e GOS totais em relação aos açúcares totais presentes em cada amostra, no tempo necessário para atingir a máxima concentração de GOS, são apresentados na Figura 1, indicando produtos de composição do meio reacional diferenciada, de acordo com a condição de reação. Um cromatograma típico é mostrado na Figura 2, mostrando a presença de galactose, glicose, lactose e GOS no meio reacional, bem como os respectivos tempos de retenção nas condições de eluição. Conforme a Figura 1, a atividade de transgalactosilação da enzima Lactozym® 3000 L foi comprovada, verificando-se a formação de GOS em todas as condições testadas; é importante mencionar que a atividade enzimática da enzima utilizada correspondeu a 3.263,2 U.mL<sup>-1</sup>. O percentual de GOS em relação aos carboidratos totais variou de 17,3% (ensaio 2) a 43,8% (ensaio 7), obtidos em 3 e 16 h de reação, respectivamente. Para a glicose, o percentual variou de 5,7% (ensaio 6) a 36,2% (ensaio 10), com 4 e 10 h de reação, respectivamente. E, para a lactose, variou de 23,2% (ensaio 3) a 66,8% (ensaio 2), em 14 e 3 h de reação, respectivamente. Em diversos ensaios não foi detectada a presença de galactose (ensaios 2, 6, 7, 8, 9, 10 e 11), sendo o maior valor observado no ensaio 3 (8,8% em 14 h de reação), seguido pelos ensaios 4



**Figura 1.** Composição dos meios reacionais no tempo necessário para atingir a máxima concentração de GOS nos diferentes ensaios.

## Síntese de galacto-oligossacarídeos a partir de lactose usando $\beta$ -galactosidase comercial de *Kluyveromyces lactis*

LISBOA, C. R. et al.



**Figura 2.** Cromatograma típico do meio reacional da síntese de GOS. Condições experimentais: 40 °C, 10 U.mL<sup>-1</sup> de enzima e 200 mg.mL<sup>-1</sup> de lactose, em 16 h de reação (ensaio 4).

(5,8% em 4 h de reação), 1 (4,2% em 12 h de reação) e 5 (2,6% em 14 h de reação). Conforme Anthony et al. (2006), um xarope comercial obtido com  $\beta$ -galactosidase de *Bacillus circulans* (Vivinal®) continha 45% de GOS, 15% de lactose, 14% de glicose e 1% de galactose.

Os perfis cinéticos dos 11 ensaios propostos foram obtidos acompanhando-se o consumo de lactose e a formação dos monossacarídeos glicose e galactose, e dos GOS, ao longo do tempo. A Figura 3 apresenta os perfis dos ensaios mais relevantes quanto à produção de GOS, correspondentes aos ensaios 5, 6, 7 e 8, que se destacaram pelas elevadas concentrações de GOS obtidas. Como pode ser observado, no tempo zero de reação (adição da enzima), não foram detectadas as presenças de glicose, galactose e GOS, indicando apenas a presença de lactose.

Ainda na Figura 3, pode-se observar o acúmulo de glicose e galactose ao longo do tempo, mas esta última em menor proporção, 11,1 e 2,0 g.L<sup>-1</sup>, ao término da reação, respectivamente nos ensaios 5 (Figura 3a) e 6 (Figura 3b). Nos ensaios 7 e 8 (Figuras 3c e 3d), não foi detectada galactose livre. Comportamento similar foi observado por Chen et al. (2002), relacionado à incorporação da galactose à molécula de GOS.

Também pode ser observado na Figura 3 que, inicialmente, ocorre uma rápida redução na concentração de lactose, acompanhada de uma maior taxa de formação de GOS. Essa taxa de produção diminui ao longo do tempo, ressaltando-se que a conversão total da lactose não foi atingida nos ensaios realizados. Cruz et al. (1999) comentam que a síntese de oligossacarídeos por  $\beta$ -galactosidase de *Penicillium simplicissimum* foi fortemente inibida quando a concentração de monossacarídeos atingiu concentrações próximas à concentração de GOS (cerca de 180 g.L<sup>-1</sup>), não havendo mais formação de GOS. Mateo et al. (2004) comentam

que as  $\beta$ -galactosidas de *Kluyveromyces* são inibidas por galactose (inibição competitiva) e glicose (inibição não competitiva).

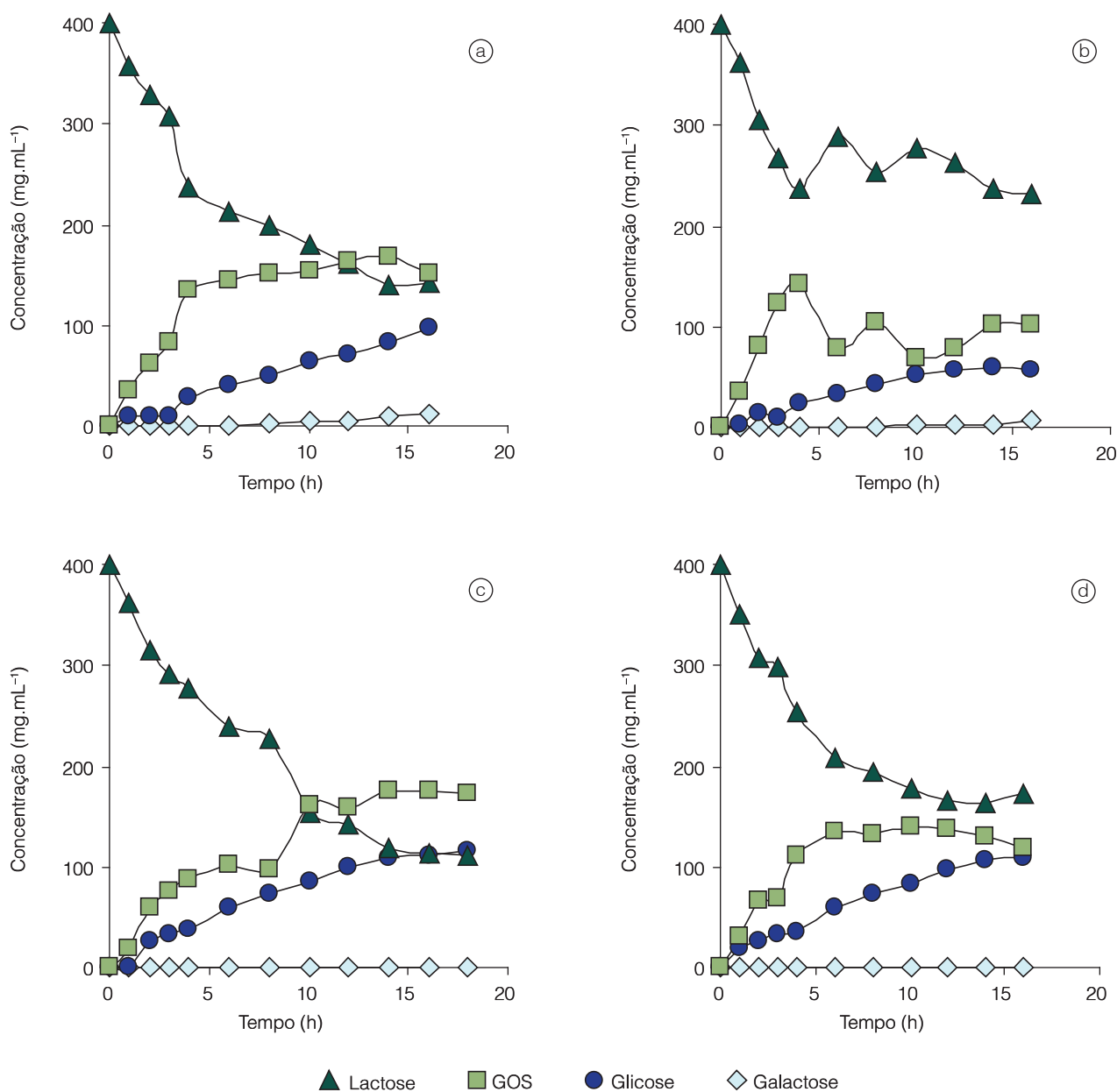
Também foram observados picos ou patamares de produção, com posterior decréscimo na concentração de GOS, comportamento este bastante evidenciado no ensaio 6 (Figura 3b) e possivelmente associado à hidrólise dos mesmos a monossacarídeos. Comportamento similar foi observado por Del Val e Otero (2003) para a enzima Pectinex® Ultra SP. A maioria dos picos de GOS ocorreu quando uma boa parte da lactose já havia sido hidrolisada (33,2 a 76,8%), mas em geral não coincidiram com a conversão máxima de lactose atingida no final do processo. Dessa forma, é importante estabelecer o tempo de reação a fim de que se evite a perda de GOS por hidrólise. De acordo com Splechtna et al. (2006), os GOS também são substratos para a hidrólise, sendo que o rendimento pode mudar drasticamente com o tempo de reação. Conforme Splechtna et al. (2007), os GOS estão sujeitos à hidrólise, sendo esta mais pronunciada quando o substrato lactose atinge níveis baixos de concentração. De acordo com Cruz et al. (1999), a partir de uma determinada concentração, os GOS são hidrolisados preferencialmente em relação à lactose, pois a enzima tem maior afinidade por ligações galactose-galactose do que ligações galactose-glicose.

### 3.2 Avaliação dos efeitos da temperatura, da concentração de enzima e da concentração de lactose

A análise estatística dos resultados do planejamento experimental (Tabela 2) revelou os efeitos principais e de interação das variáveis sobre as respostas estudadas, conforme apresentado na Figura 4. O efeito principal de uma variável independente pode ser entendido como a variação causada na resposta (variável dependente)

Síntese de galacto-oligosacarídeos a partir de lactose usando  $\beta$ -galactosidase comercial de *Kluyveromyces lactis*

LISBOA, C. R. et al.



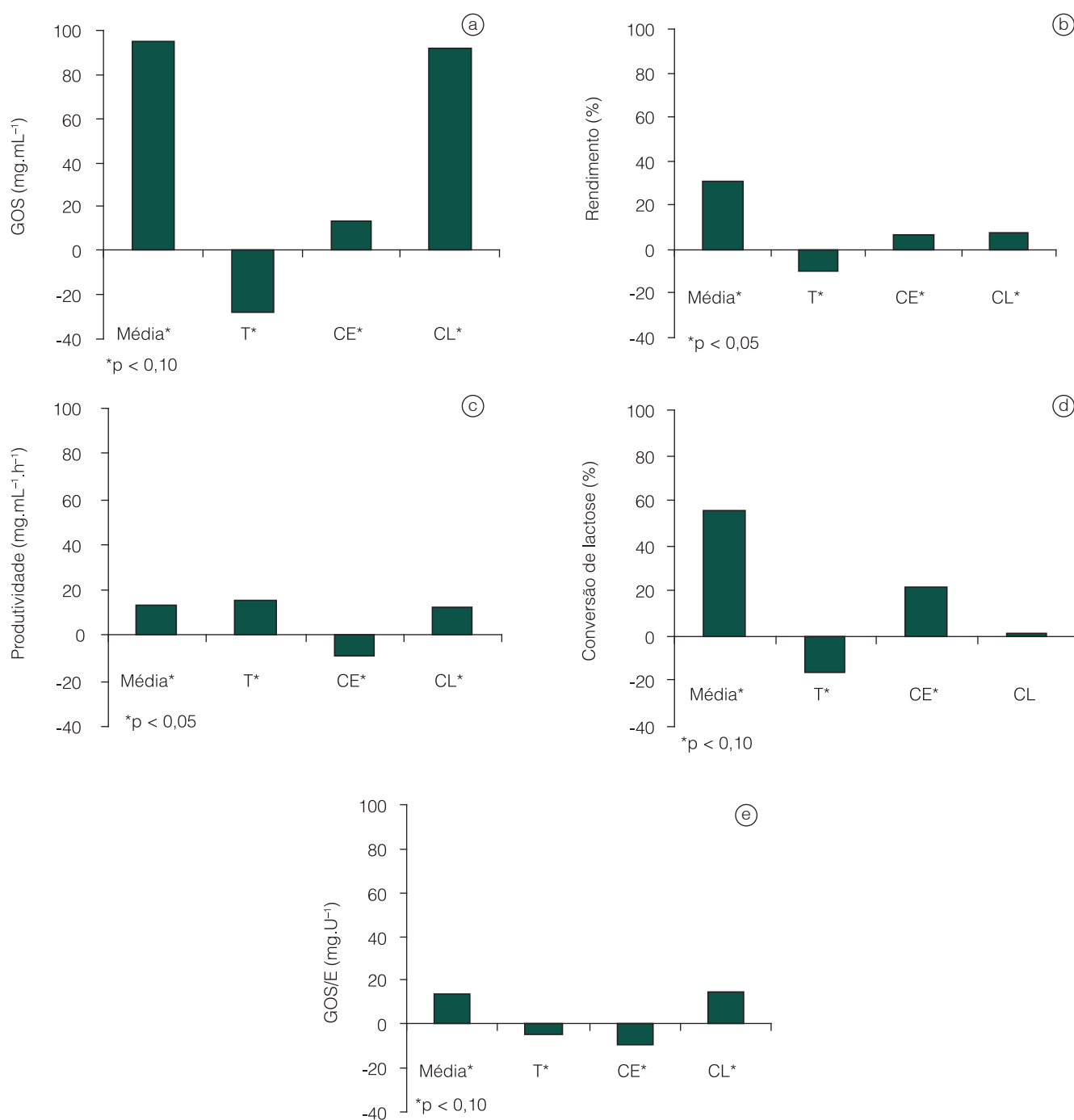
**Figura 3.** Consumo de lactose e formação de GOS, glicose e galactose durante reações catalisadas por Lactozym® 3000 L. a) Ensaio 5; b) ensaio 6; c) ensaio 7; d) ensaio 8.

**Tabela 2.** Resultados do planejamento experimental para a concentração de GOS, o rendimento, a produtividade, a conversão da lactose e a razão GOS/E.

Ensaio	Tempo (h)	GOS (mg.mL <sup>-1</sup> )	Rendimento (%)	Produtividade (mg.mL <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	Conversão de lactose (%)	GOS/E (mg.U <sup>-1</sup> )
1	12	67,0	33,5	5,6	51,1	13,4
2	3	34,7	17,3	11,6	33,2	6,9
3	14	84,0	42,0	6,0	76,8	8,4
4	4	67,5	33,8	16,9	71,7	6,8
5	14	167,5	41,9	12,0	65,0	33,5
6	4	141,4	35,4	35,4	41,1	28,3
7	16	175,3	43,8	10,9	71,5	17,5
8	10	138,5	34,6	13,8	55,6	13,9
9	10	61,2	20,4	6,1	50,1	8,2
10	10	52,4	17,5	5,2	53,6	7,0
11	6	54,0	18,0	9,0	39,3	7,2

## Síntese de galacto-oligosacarídeos a partir de lactose usando $\beta$ -galactosidase comercial de *Kluyveromyces lactis*

LISBOA, C. R. et al.



**Figura 4.** Efeitos principais das variáveis temperatura (T), concentração de enzima ( $C_E$ ) e concentração de lactose ( $C_L$ ) sobre a concentração de GOS (a), o rendimento (b), a produtividade (c), a conversão de lactose (d) e a razão GOS/E (e).

quando se percorrem todos os níveis de variação da variável independente que está sendo avaliada, em separado das demais variáveis (RODRIGUES e IEMMA, 2005).

Na Figura 4a, pode-se observar que a concentração de lactose foi a variável que mais influenciou positivamente a resposta concentração de GOS, já que seu efeito ficou muito próximo ao da média dos ensaios. Ao passar de 200 para 400 mg.mL<sup>-1</sup> de lactose, houve incremento médio na concentração de GOS de 92,3 mg.mL<sup>-1</sup>. Um efeito

similar nessa resposta ocorreu com o aumento de 5 para 10 U.mL<sup>-1</sup>, resultando em incremento de 15 mg.mL<sup>-1</sup>. A variável temperatura apresentou um efeito contrário, pois com o aumento de 30 para 40 °C ocorreu uma diminuição em média de 27,9 mg.mL<sup>-1</sup> na concentração de GOS.

O incremento de 5 para 10 U.mL<sup>-1</sup> na concentração de enzima, bem como o aumento de 200 para 400 mg.mL<sup>-1</sup> na concentração de lactose, influenciaram o rendimento positivamente, aumentando-o em média 7,8 e 8,5%, respectivamente, como se pode observar na Figura 4b.

## Síntese de galacto-oligossacarídeos a partir de lactose usando $\beta$ -galactosidase comercial de *Kluyveromyces lactis*

LISBOA, C. R. et al.

No entanto, o incremento da temperatura de 30 para 40 °C apresentou um efeito negativo, diminuindo em 11,2% o rendimento da síntese enzimática.

Portanto, considerando-se apenas as respostas concentração de GOS e rendimento, a condição de síntese enzimática do ensaio 7 (30 °C, 10 U.mL<sup>-1</sup>, 400 mg.mL<sup>-1</sup>), em que as concentrações de lactose e enzima encontravam-se no nível superior (+1) e a temperatura no menor nível (-1), favoreceu o maior rendimento (43,8%) e a concentração de GOS (175,3 mg.mL<sup>-1</sup>), em 16 h de reação. Para esse tempo de reação, as concentrações de glicose e lactose foram de 110,8 e 113,9 mg.mL<sup>-1</sup>, respectivamente, não se detectando a presença de galactose. No meio reacional, quantificaram-se 43,8% de GOS, 27,7% de glicose e 28,5% de lactose, o que corresponde a uma conversão de lactose de 71,5%, podendo-se considerar este um resultado expressivo quando comparado com  $\beta$ -galactosidases de outras fontes.

Czermak et al. (2004) obtiveram um rendimento de 40% de GOS a partir de uma solução de lactose a 31% com a enzima Maxilact® L2000, em um sistema operando em modo contínuo. Cruz et al. (1999), utilizando  $\beta$ -galactosidase de *Penicillium simplicissimum* e concentração inicial de lactose de 60%, conseguiram 30,5% de GOS, correspondendo a uma concentração de 183 mg.mL<sup>-1</sup>. Chen et al. (2001) atingiram 31% de rendimento utilizando  $\beta$ -galactosidases de *Aspergillus oryzae* e concentração de lactose de 40%. Splechtna et al. (2007) obtiveram, em seus experimentos, 36% de rendimento e grau de conversão de lactose de 80% usando  $\beta$ -galactosidase de *Lactobacillus reuteri*, para concentração inicial de lactose de 205 mg.mL<sup>-1</sup>. Hsu et al. (2007), usando  $\beta$ -galactosidases de *Bifidobacterium longum* BCRC 157C8, obtiveram 32,5% de rendimento e 59,4% de conversão de lactose utilizando solução de lactose a 40%. Rendimentos superiores, da ordem de 50%, são relatados para  $\beta$ -galactosidases termoestáveis, como a de *Talaromyces thermophilus* (NAKKHARAT et al., 2006).

Na Figura 4c, pode-se observar que o aumento na concentração de lactose de 200 para 400 mg.mL<sup>-1</sup>, bem como o aumento em 10 °C na temperatura, influenciaram positivamente a produtividade, aumentando-a em 12,3 e 15,4 mg.mL<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>, respectivamente. No entanto, ao duplicar a concentração de enzima usada na reação de síntese, ocorreu um efeito negativo, diminuindo a produtividade, em média, de 8,6 mg.mL<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>. A maior produtividade (35,4 mg.mL<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>) foi atingida no ensaio 6 (40 °C, 5 U.mL<sup>-1</sup>, 400 mg.mL<sup>-1</sup>), reflexo do menor tempo de reação observado para se atingir a máxima concentração de GOS. No entanto, nestas condições experimentais, houve baixa conversão de lactose (41,1%), obtendo-se um produto com alto percentual de lactose

(58,9%), não desejável. Santos et al. (2009) comentam que a temperatura elevada pode desfavorecer a reação enzimática em tempos de reação prolongados, pois a taxa de desnaturação torna-se mais pronunciada à medida que o tempo de reação se estende. Corroborando para esse fato o efeito contrário observado com o aumento da temperatura na conversão de lactose (Figura 4d), diminuindo o grau de hidrólise desse dissacarídeo.

O efeito das variáveis na conversão de lactose pode ser observado na Figura 4d. O aumento da concentração de enzima de 5 para 10 U.mL<sup>-1</sup> influenciou positivamente a conversão de lactose, incrementando em média a resposta em 21,3%. No entanto, o aumento de 30 para 40 °C da temperatura apresentou um efeito negativo, diminuindo em média 15,7%, enquanto que a concentração de lactose inicial não influenciou significativamente essa resposta ( $p < 0,1$ ). Assim, de acordo com a análise de efeitos principais, o maior grau de hidrólise (76,7%) foi alcançado no ensaio 3 em 14 h de reação, correspondendo ao sistema reacional composto por 10 U.mL<sup>-1</sup> de enzima (nível +1) e 200 mg.mL<sup>-1</sup> de lactose a 30 °C (nível - 1). De acordo com Hsu et al. (2007), concentrações menores de lactose levam a um menor acúmulo de glicose e galactose, que atuam como inibidores de diferentes  $\beta$ -galactosidases, o que favorece graus de hidrólise mais elevados, como observado neste trabalho.

Os incrementos do nível inferior (-1) para o nível superior (+1) na temperatura e na concentração de enzima promoveram um efeito negativo na razão GOS/E (Figura 4e), diminuindo em média 4,2 e 8,9 mg.U<sup>-1</sup>, respectivamente. Porém, o incremento de 200 para 400 mg.mL<sup>-1</sup> na concentração de lactose influenciou positivamente, aumentando em média 14,4 mg.U<sup>-1</sup> essa resposta.

No ensaio 5 (30 °C, 5 U.mL<sup>-1</sup>, 400 mg.mL<sup>-1</sup>), em que a temperatura e a concentração de enzima encontravam-se no nível inferior (-1) e com maior concentração de lactose (nível +1), foi alcançada a maior razão GOS/E: 33,5 mg.U<sup>-1</sup>. Para este ensaio, as concentrações de GOS, glicose, galactose e lactose foram de 167,5, 81,8, 10,6 e 140,2 mg.mL<sup>-1</sup>, respectivamente. O produto apresentou 41,9% de GOS, 20,5% de glicose, 2,6% de galactose e 35,0% de lactose, o que corresponde a uma conversão de lactose de 65,0%.

De uma maneira geral, portanto, pode-se afirmar que o aumento da temperatura apresentou efeito negativo sobre a concentração de GOS, o rendimento, a conversão de lactose e a razão GOS/E; tal efeito deu-se, possivelmente, pela perda de atividade enzimática da  $\beta$ -galactosidase, por causa da sua exposição por um longo período de tempo a 40 °C.

Por outro lado, o aumento da concentração de lactose teve um efeito importante sobre a formação de



## Síntese de galacto-oligosacarídeos a partir de lactose usando $\beta$ -galactosidase comercial de *Kluyveromyces lactis*

LISBOA, C. R. et al.

GOS. A transgalactosilação é um processo no qual a enzima  $\beta$ -galactosidase hidrolisa a lactose e, em vez de transferir a unidade de galactose para o grupo hidroxila da água, transfere para um composto hidroxilado, que pode ser a galactose, a lactose ou o GOS. Dessa forma, em baixas concentrações de lactose, a transgalactosilação é inferior à hidrólise, pois a quantidade de grupos hidroxila de carboidratos é baixa, resultando em uma maior quantidade de glicose e galactose na solução (HSU et al., 2007). Portanto, para aumentar a transgalactosilação, maiores concentrações de lactose são requeridas, mas menores concentrações desse dissacarídeo favorecem a hidrólise.

As maiores concentrações de GOS e os maiores rendimentos foram obtidos nos ensaios 5 e 7, que se diferenciam pela concentração de enzima (5 e 10 U.mL<sup>-1</sup>, respectivamente), tendo a mesma temperatura (30 °C) e a mesma concentração de lactose (400 mg.mL<sup>-1</sup>). Observa-se ainda que, no ensaio 5, a razão GOS/E, que indica a quantidade de GOS formada por unidade de atividade enzimática, foi cerca de 91,4% superior ao ensaio 7. Portanto, usando 5 U.mL<sup>-1</sup>, foi possível atingir cerca de 95,6% da quantidade produzida com a utilização de 10 U.mL<sup>-1</sup>. Conforme comentado por Santos et al. (2009), o aumento da concentração da enzima não é proporcional ao aumento da concentração de GOS e a limitação da produção não está relacionada apenas com a concentração da enzima. Com a menor concentração de enzima, houve uma redução na conversão de lactose de cerca de 9,8%, mas um ganho de produtividade de cerca de 9,2%. Dessa forma, o uso de uma menor concentração de enzima pode representar, na condução do processo em escala industrial, significativa redução de custos – já que a enzima contribui significativamente no custo das matérias-primas e insumos – sem perdas importantes no rendimento do processo.

### 4 Conclusões

A análise multivariada dos efeitos da temperatura, da concentração de enzima e da concentração de lactose sobre a síntese de GOS a partir de  $\beta$ -galactosidase comercial de *Kluyveromyces lactis* (Lactozym® 3000 L), com atividade igual a 3.263,2 U.mL<sup>-1</sup>, revelou que as condições mais adequadas para o processo são: temperatura de 30 °C, concentração de enzima de 5 U.mL<sup>-1</sup> e concentração de lactose de 400 mg.mL<sup>-1</sup>. Nessas condições, foi obtido um produto contendo 2,6% de galactose (10,6 mg.mL<sup>-1</sup>), 20,5% de glicose (81,8 mg.mL<sup>-1</sup>), 35,0% de lactose (140,2 mg.mL<sup>-1</sup>) e 41,9% de GOS (167,5 mg.mL<sup>-1</sup>), com uma razão GOS/E de 33,5 mg.U<sup>-1</sup>. A produtividade alcançada foi de 12,0 mg.mL<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> e a conversão de lactose foi de 65,0%.

### Agradecimentos

Ao Programa de Cooperação Acadêmica (PROCAD) da CAPES (Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pelo apoio financeiro ao projeto. À FAPERGS (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul), pelo apoio financeiro e pela concessão de Bolsa de Iniciação Científica. À CAPES, pela concessão de Bolsa de Pós-Graduação.

### Referências

- AKIYAMA, K.; TAKASE, M.; HORIKOSHI, K.; SHIGEO, O. Production of galactooligosaccharides from lactose using a  $\beta$ -glucosidase from *Thermus* sp. Z-1. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v. 65, n. 2, p. 438-441, 2001.
- ANTHONY, J. C.; MERRIMAN, T. N.; HEIMBACH, J. T. 90-Day oral (gavage) study in rats with galactooligosaccharides syrup. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 44, n. 6, p. 819-826, 2006. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2005.10.012>
- BERGER, J. L.; LEE, B. H.; LACROIX, C. Purification, properties and characterization of a high-molecular-mass  $\beta$ -galactosidase isoenzyme from *Thermus aquaticus* YT-1. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, London, v. 25, n. 1, p. 29-41, 1997. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1470-8744.1997.tb00411.x>
- 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**, Oxford, v. 26, n. 2-4, p. 271-281, 2000. [http://dx.doi.org/10.1016/S0141-0229\(99\)00167-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0141-0229(99)00167-2)
- BOUHNİK, Y.; FLOURIE, B.; D'AGAY-ABENSOUR, L.; POCHART, P.; GRAMET, G.; DURAND, M.; RAMBAUD, J. C. Administration of transgalacto-oligosaccharides increases fecal bifidobacteria and modifies colonic fermentation metabolism in healthy humans. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 127, n. 3, p. 444-448, 1997.
- CARDELLE-COBAS, A.; VILLAMIEL, M.; OLANO, A.; CORZO, N. Study of galacto-oligosaccharide formation from lactose using Pectinex Ultra SP-L. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Davis, v. 88, n. 6, p. 954-961, 2008. <http://dx.doi.org/10.1002/jsfa.3173>
- CHEN, C. S.; HSU, C. K.; CHIANG, B. H. Optimization of the enzymic process for manufacturing low-lactose milk containing oligosaccharides. **Process Biochemistry**, Vandoeuvre-les-Nancy, v. 38, n. 5, p. 801-808, 2002. [http://dx.doi.org/10.1016/S0032-9592\(02\)00151-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0032-9592(02)00151-6)
- CHEN, S. X.; WEI, D. Z.; HU, Z. H. Synthesis of galacto-oligosaccharides in AOT/isooctane reverse micelles by  $\beta$ -galactosidase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, Delft, v. 16, n. 2, p. 109-114, 2001. [http://dx.doi.org/10.1016/S1381-1177\(01\)00051-0](http://dx.doi.org/10.1016/S1381-1177(01)00051-0)

**Síntese de galacto-oligosacarídeos a partir de lactose usando  $\beta$ -galactosidase comercial de *Kluyveromyces lactis***LISBOA, C. R. *et al.*

- CHOCKCHAIWASDEE, S.; ATHANASOPOULOS, V. I.; NIRANJAN, K.; RASTALL, R. A. Synthesis of galacto-oligosaccharide from lactose using  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*: studies on batch and continuous UF membrane-fitted bioreactors. **Biotechnology and Bioengineering**, Hoboken, v. 89, n. 4, p. 434-443, 2005. <http://dx.doi.org/10.1002/bit.20357>
- CHONAN, O.; MATSUMOTO, K.; WATANUKI, M. Effect of galactooligosaccharides on calcium absorption and preventing bone loss in ovariectomized rats. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v. 59, n. 2, p. 236-239, 1995.
- CRUZ, R.; CRUZ, V. D.; BELOTE, J. G.; KHENAYFES, M. O.; DORTA, C.; OLIVEIRA, L. H. S.; ARDILES, E.; GALLI, A. Production of transgalactosylated oligosaccharides (TOS) by galactosyltransferase activity from *Penicillium simplicissimum*. **Bioresource Technology**, Fayetteville, v. 70, n. 2, p. 165-171, 1999. [http://dx.doi.org/10.1016/S0960-8524\(99\)00033-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0960-8524(99)00033-4)
- CZERMAK, P.; EBRAHIMI, M.; GRAU, K.; NETZ, S.; SAWATZKI, G.; PFROMM, P. H. Membrane-assisted enzymatic production of galactosyl-oligosaccharides from lactose in a continuous process. **Journal of Membrane Science**, Pennsylvania, v. 232, n. 1-2, p. 85-91, 2004. <http://dx.doi.org/10.1016/j.memsci.2003.11.024>
- DEL-VAL, M. I.; OTERO, C. Biphasic aqueous media containing polyethylene glycol for the enzymatic synthesis of oligosaccharides from lactose. **Enzyme and Microbial Technology**, Atlanta, v. 33, n. 1, p. 118-126, 2003. [http://dx.doi.org/10.1016/S0141-0229\(03\)00098-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0141-0229(03)00098-X)
- HARTEMINK, R.; VAN LAERE, K. M. J.; PEETERS, C. C. K. M.; NOUT, M. J. R.; ROMBOUTS, F. M. *In vitro* cariogenicity of transgalactosyl-oligosaccharides. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 25, n. 1, p. 38-42, 1997. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1472-765X.1997.00165.x>
- HSU, C. A.; LEE, S. L.; CHOU, C. C. Enzymatic production of galactooligosaccharides by  $\beta$ -galactosidase from *Bifidobacterium longum* BCRC 15708. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 55, n. 6, p. 2225-2230, 2007. <http://dx.doi.org/10.1021/jf063126>
- HUBER, R.E.; KURZ, G.; WALLENFELS, K. A quantitation of the factors which affect the hydrolase and transgalactosylase activities of  $\beta$ -galactosidase (*E. coli*) on lactose. **Biochemistry**, Nashville, v. 15, n. 9, p. 1994-2001, 1976. <http://dx.doi.org/10.1021/bi00654a029>
- INCHAURRONDO, V. A.; YANTORNO, O. M.; VOGET, C. E. Yeast growth and  $\beta$ -galactosidase production during aerobic batch cultures in lactose-limited synthetic medium. **Process Biochemistry**, Vandoeuvre-les-Nancy, v. 29, n. 1, p. 47-54, 1994. [http://dx.doi.org/10.1016/0032-9592\(94\)80058-8](http://dx.doi.org/10.1016/0032-9592(94)80058-8)
- LISBOA, C. R. **Síntese Enzimática de Galacto-Oligossacarídeos a Partir de Lactose e Soro de Leite**. 2008. 76 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos)-Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2008.
- MATEO, C.; MOUTI, R.; PESSELA, B. C. C.; FUENTES, M.; TORRES, R.; GUISÁN, J. M.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Immobilization of lactase from *Kluyveromyces lactis* greatly reduces the inhibition promoted by glucose. Full hydrolysis of lactose in milk. **Biotechnology Progress**, Washington, v. 20, n. 4, p. 1259-1262, 2004. <http://dx.doi.org/10.1021/bp049957m>
- MATIOLI, G.; MORAES, F. F.; ZANIN, G. M. Hydrolysis of lactose by  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*: characterization of the enzyme. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 23, n. 3, p. 655-659, 2001.
- MORO, G. E.; STAHL, B.; FANARO, S.; JELINEK, J.; BOEHM, G.; COPPA, G. V. Dietary prebiotic oligosaccharides are detectable in the faeces of formula-fed infants. **Acta Paediatrica**, Stockholm, v. 94, s. 449, p. 27-30, 2005. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1651-2227.2005.tb02151.x>
- NAKKHARAT, P.; KULBE, K. D.; YAMABHAI, M.; HALTRICH, D. Formation of galacto-oligosaccharides during lactose hydrolysis by a novel  $\beta$ -galactosidase from the moderately thermophilic fungus *Talaromyces thermophilus*. **Biotechnology Journal**, Weinheim, v. 1, n. 6, p. 633-638, 2006. <http://dx.doi.org/10.1002/biot.200600013>
- PAZUR, J. H. Oligosaccharides. In: PIGMAN, W.; HORTON, D. (Ed). **The Carbohydrates: Chemistry and Biochemistry**. 2. ed. New York: Academic Press, 1970. p. 69-137.
- RODRIGUES, I. M.; IEMMA, A. F. **Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos**. Campinas: Editora Casa do Pão, 2005. 326 p.
- SAKO, T.; MATSUMOTO, K.; TANAKA, R. Recent progress on research and applications of non-digestible galacto-oligosaccharides. **International Dairy Journal**, Edmonton, v. 9, n. 1, p. 69-80, 1999. [http://dx.doi.org/10.1016/S0958-6946\(99\)00046-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0958-6946(99)00046-1)
- SANTOS, R.; SIMIQUELI, A. P. R.; PASTORE, G. Produção de galactooligosacarídeos por *Scopulariopsis* sp. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 29, n. 3, p. 682-689, 2009. <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612009000300035>
- SHOAF, K.; MULVEY, G. L.; ARMSTRONG, G. D.; HUTKINS, R. W. Prebiotic galactooligosaccharides reduce adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to tissue culture cells. **Infection and Immunity**, Washington, v. 74, n. 12, p. 6920-6928, 2006.
- SPLICHTNA, B.; NGUYEN, T. H.; HALTRICH, D. Comparison between discontinuous and continuous lactose conversion processes for the production of prebiotic galacto-oligosaccharides using  $\beta$ -galactosidase from *Lactobacillus reuteri*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 55, n. 16, p. 6772-6777, 2007. <http://dx.doi.org/10.1021/jf070643z>

**Síntese de galacto-oligosacarídeos a partir de lactose usando  $\beta$ -galactosidase comercial de *Kluyveromyces lactis***

LISBOA, C. R. et al.

SPLECHTNA, B.; NGUYEN, T. H.; STEINBÖCK, M.; KULBE, K. D.; LORENZ, W.; HALTRICH, D. Production of prebiotic galacto-oligosaccharides from lactose using  $\beta$ -galactosidases from *Lactobacillus reuteri*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 54, n. 14, p. 4999-5006, 2006. <http://dx.doi.org/10.1021/jf053127m>

TEURI, U.; KORPELA, R. Galacto-oligosaccharides relieve constipation in elderly people. **Annals of Nutrition & Metabolism**, Munich, v. 42, n. 6, p. 319-327, 1998. <http://dx.doi.org/10.1159/000012751>

TZORTZIS, G.; VULEVIC, J. Galacto-oligosaccharide prebiotics. In: CHARALAMPOPOULOS, D.; RASTALL, R.A. (Ed). **Prebiotics**

**and Probiotics Science and Technology**. New York: Springer, 2009. p. 207-244.

WALLENFELS, K.; MALHOTRA, O. P. Galactosidases. **Advances in Carbohydrate Chemistry**, New York, v. 16, p. 239-298, 1962.

VAN LOO, J.; CUMMINGS, J.; DELZENNE, N.; ENGLYST, H.; FRANCK, A.; HOPKINS, M.; KOK, N.; MACFARLANE, G.; NEWTON, D.; QUIGLEY, M.; ROBERFROID, M.; VAN VLIET, T.; VAN DEN HEUVEL, E. Functional food properties of non-digestible oligosaccharides: a consensus report from the ENDO project (DGXII AIRII-CT94-1095). **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 81, n. 2, p. 121-132, 1999.

WHITAKER, J. R. **Principles of Enzymology for the Food Sciences**. New York: Marcel Dekker Inc., 1972. 636 p.