

Avanços Tecnológicos na Obtenção, Purificação e Identificação de Galactooligosacarídeos e Estudo de suas Propriedades Prébióticas

Technological Advances in the Collection, Purification and Identification of Galactooligosaccharide and Study of their Prebiotic Properties

Adriana Aparecida Bosso Tomal^a; Magda Elisa Turini da Cunha^b; Alessandra Bosso^c; Elza Youssef Youssef^d
Hélio Hiroshi Suguimoto^{d*}

Resumo

Os oligossacarídeos são amplamente utilizados nas indústrias de alimentos e de medicamentos. Especificamente o galactooligosacarídeo (GOS) possui importantes características promotoras da saúde e é considerado como substância prebiótica. Assim, o objetivo do trabalho foi realizar uma revisão sobre a obtenção, identificação, purificação do Galactooligosacarídeo e das suas propriedades prebióticas. Nos resultados verificou-se que os efeitos prebióticos mais expressivos encontrados foram a produção de ácidos graxos de cadeia curta e o aumento na absorção de nutrientes. Quanto a produção de GOS os valores são variáveis de 5 a 64% de acordo com a origem da enzima e das condições de reação, em especial o pH, a temperatura e a concentração inicial de lactose. Os métodos mais utilizados para identificação e quantificação de GOS é a cromatografia líquida de alta eficiência utilizando detectores de índice de refração e de pulso amperométrico com diferentes tipos de colunas e fase móvel.

Palavras-chave: Prebióticos. Oligossacarídeos. beta-Galactosidase. Leite. Lactose.

Abstract

The oligosaccharides are widely used in food and medicines industry. Specifically, the galactooligosaccharide (GOS) has significant health-promoting characteristics and it is considered prebiotic substance. Thus, the objective was to conduct a review on the collection, identification, purification of Galactooligosaccharides and their prebiotic properties. The results showed that the most expressive prebiotic effects was the production of short chain fatty acids and increased nutrient absorption. As for GOS production values are extremely variable from 5 to 64% according to the source of the enzyme and reaction conditions, especially pH, temperature and initial concentration of lactose. The most common methods for identification and quantification of GOS is the high efficiency liquid chromatography using refractive index detector and amperometric pulse with different columns and mobile phase.

Keywords: Prebiotics. Oligosaccharides. beta-Galactosidase. Milk. Lactose.

^a Mestre em Química - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ). Docente da Universidade Norte do Paraná (UNOPAR). E-mail: adriana1@unopar.br

^b Doutora em Agronomia - Universidade Estadual de Londrina (UEL). Docente da Universidade Norte do Paraná (UNOPAR). E-mail: meturini@gmail.com

^c Mestranda em Ciência e Tecnologia do Leite - Universidade Norte do Paraná (UNOPAR). E-mail: alessandrabosso@yahoo.com.br

^d Doutora em Ciências dos Alimentos - Universidade de São Paulo (USP). Farmacêutica-Bioquímica - Laboratório de Tecnologia e Ciências dos Alimentos - Universidade Estadual de Londrina (UEL). E-mail: youssef@uel.br

^e Doutor em Ciências de Alimentos - Universidade Estadual de Londrina (UEL). Docente da Universidade Norte do Paraná (UNOPAR). E-mail: heliohs@unopar.br

* Endereço para correspondência: Av. Paris, 675, CEP: 86041-120, Londrina-PR.

1 Introdução

Os carboidratos que participam da dieta são classificados pelo peso molecular e pelo grau de polimerização (GP) em monossacarídeos, oligossacarídeos (GP=2-10) e polissacarídeos (GP>10). Também podem ser classificados baseados nas propriedades fisiológicas de digeríveis ou não digeríveis. Galactooligosacarídeos (GOS) são os oligossacarídeos provenientes da lactose, estão incluídos como carboidratos não-digeríveis, e que possuem propriedades prebióticas, tais como: a produção de ácidos graxos benéficos

de cadeia curta, aumento da absorção de cálcio e magnésio, resistência à hidrólise das enzimas digestivas intestinais e possuem efeitos fisiológicos semelhantes aos das fibras dietéticas. Estão disponíveis comercialmente em países como o Japão, na forma líquida ou em pó; em uma mistura contendo oligossacarídeos, lactose, glicose e galactose.

A produção de galactooligosacarídeos ocorre pela reação entre lactose e β -galactosidase conhecida como transgalactosilação, e os subprodutos obtidos são glicose e galactose. As principais fontes de β -galactosidase utilizadas para a síntese de GOS são leveduras, bactérias e fungos.

Os galactooligosacarídeos vêm sendo estudados desde a década de 50 e nos primeiros estudos para síntese foram utilizadas β -galactosidasas de *Kluyveromyces lactis* e *Escherichia coli*.

Os fatores que podem afetar a produção de GOS são: pH, temperatura e concentração de lactose. O pH e a temperatura estão diretamente relacionados à fonte enzimática e a alta concentração de lactose garante a formação dos GOS por transgalactosilação, enquanto a baixa concentração favorece a reação de hidrólise. Embora haja vasta pesquisa sobre os fatores que afetam a produção de GOS, poucos trabalhos apresentam síntese com mais de 40% de rendimento e, a maioria das sínteses apresentam baixo rendimento.

Os GOS podem ser identificados por métodos cromatográficos, sendo o mais eficaz a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

As técnicas de separação de GOS do meio fermentado mais eficientes são: cromatografia por adsorção e por exclusão, pois garantem maior rendimento na recuperação de GOS que podem se utilizados como fonte de prebióticos.

O objetivo do trabalho foi realizar uma revisão das características prebióticas dos galactooligossacarídeos bem como os principais métodos de obtenção, purificação e identificação.

2 Oligossacarídeos

Os carboidratos constituem a principal fonte calórica para os seres humanos, sendo responsável por 50 % do total de calorias na dieta regular¹. Recentemente grande número de pesquisas sobre a produção e aplicação de oligossacarídeos tem surgido devido às suas propriedades fisiológicas e tecnológicas. São utilizados na indústria de alimentos (bebidas, adoçantes, formulação de leite em pó infantil), em ração animal com inibidor de salmonela, além da aplicação medicinal (cosméticos, produtos farmacêuticos e produtos para diabéticos)². Entretanto, o principal interesse na produção de oligossacarídeos não se encontra particularmente no seu uso como adoçante alternativo, mas no estímulo da produção de bifidobactérias (microbiota benéfica) no intestino^{3,4}.

Vários oligossacarídeos não são digeríveis pelo organismo humano, pois não possuem as enzimas necessárias para romper as ligações do tipo β formadas pelas unidades de monossacarídeos. Outros oligossacarídeos são parcialmente hidrolisados no trato gastrointestinal e podem resultar na formação de carboidratos essenciais para a saúde, os quais servem de substratos e reguladores para a maioria das rotas metabólicas⁵. Os monossacarídeos resultantes desta hidrólise parcial são transportados pelo sangue até o fígado e, posteriormente, para a circulação sistêmica. Esses carboidratos são essenciais para a saúde, servem como substratos e reguladores das principais vias metabólicas⁶.

Exemplo de oligossacarídeo produzido comercialmente é a inulina, cujo uso em alimentos e os efeitos fisiológicos associados aos seres humanos têm sido estudados nas últimas duas décadas. A inulina é reserva de carboidrato em muitas plantas dicotiledôneas e pode ser extraída de raízes de chicória e de outros vegetais⁷.

A oligofrutose é outro oligossacarídeo importante na indústria de alimentos funcionais, sendo formado por 2 a 4 unidades de frutose ligadas a um resíduo terminal de glicose⁸. O xilooligossacarídeo, é obtidos a partir de hidrólise parcial de polixilanos realizada pela β -xilanas. O glicooligossacarídeo é obtido por transglicosilação da glicose via α -glicosidase⁹.

3 Galactooligossacarídeo

O galactooligossacarídeo (GOS) é o oligossacarídeo proveniente da galactose, está incluído entre os oligossacarídeos não digeríveis (NDO, Non Digestible Oligosaccharides) e licenciado como aditivo de alimentos FOSHU (Foods for Specified Health Use) pelo Ministério da Saúde do Japão¹⁰.

Comercialmente o GOS é uma mistura de várias espécies moleculares de oligossacarídeos (mais que 55%), lactose (aproximadamente 20%), glicose (aproximadamente 20%) e uma pequena quantidade de galactose, sendo comercializados na forma líquida ou em pó. O galactooligossacarídeo podem ser usados como adoçante, em produtos como: leite fermentado, pães, geléias, bebidas e produtos de confeitaria. O pão é um alimento apropriado para a sua inclusão, pois durante a fermentação com a levedura e o cozimento, o GOS não é degradado, e auxilia no sabor e textura. Leite fermentado adicionado de GOS é produzido no Japão e na Europa (tabela 1)¹¹.

Tabela 1: Galactooligossacarídeos comerciais

Produto	Quantidade de GOS	Fornecedores
TO-syrup (Syrup)	60% sólido	Borculo Whey Products, Netherlands
Oligomate 55 (Syrup)	> 55% sólido	Yakult Honsha Co. Ltd, Japan
Oligomate 55 P (Powder)	> 55%	
TOS- 100 (Powder)	> 99%	
Cup-Oligo H-70 (Syrup)	70% sólido	Nissin Sugar Manufacturing Co.Ltd, Japan
Cup-Oligo P (Powder)	70%	

Fonte: Adaptado de Sanz Valero¹¹

4 Efeitos Prebióticos do GOS e Sinergia com Probióticos

Dentre os alimentos funcionais destacam-se os probióticos e prebióticos. Os probióticos são microrganismos vivos, que quando administrados em quantidades adequadas, garantem propriedades benéficas à saúde do hospedeiro. Essas propriedades conferem aumento da resistência contra patógenos. Os prebióticos são componentes alimentares não digeríveis que atuam seletivamente na proliferação ou atividade de populações de bactérias desejáveis no cólon¹².

Os GOS possuem propriedades tais como a produção de ácidos graxos benéficos de cadeia curta, aumento da absorção de cálcio e magnésio, além da eliminação de compostos tóxicos¹³. São resistentes à hidrólise das enzimas digestivas intestinais e possuem efeitos fisiológicos semelhantes ao das fibras dietéticas. Porém são hidrolisados a pequenos oligômeros ou monômeros pelas bactérias anaeróbias do cólon, em especial as bifidobactérias, onde sua redução ou desaparecimento no intestino indica um estado “não saudável”^{14,15}.

No intestino grosso os GOS podem ser consumidos apenas por bifidobactérias e os lactobacilos, estimulando seu crescimento, afetando benéficamente a saúde do hospedeiro. Por esta razão, GOS é denominado “fator de crescimento Bifidus”¹⁶.

Os subprodutos de GOS produzidos por bifidobactérias incluem ácidos graxos de cadeia curta além de CO₂, CH₄, H₂, e alguns antibióticos. Os ácidos graxos alteram o pH do intestino grosso para ligeiramente ácido. Esta mudança no pH altera a composição da microflora intestinal, aumentando a quantidade de bactérias benéficas (*Lactobacillus* e *Bifidobacterium*) e diminuindo a quantidade de substâncias nocivas (putrefação) bactéria (*Clostridium*, *E. coli*), até que o equilíbrio seja alcançado. Esta redução na quantidade de bactérias prejudiciais inclui bactérias patogênicas (*Salmonella*, *Shigella*, *Staphylococcus* e outros), ajudando o organismo a prevenir infecções¹¹. A associação dos efeitos positivos do consumo de GOS junto à microbiota intestinal humana e sua influência ao metabolismo e ao crescimento de bifidobactérias, e a consequente inibição de bactérias patogênicas, é apontada como a nova fronteira para desenvolvimento de produtos lácteos funcionais¹⁷.

5 Benefícios à Saúde Atribuídos ao Consumo de Galactooligossacarídeos

Dentre os efeitos benéficos dos GOS citados na literatura estão: modificação significativa na microflora colonizadora do cólon; estímulo à produção de nutrientes; decréscimo no pH do cólon e maior produção dos ácidos graxos de cadeia curta; incremento na excreção fecal de massa seca; aumento na umidade do bolo fecal através de pressão osmótica; inibição da diarreia; efeito protetor contra infecções nos tratos gastrintestinal, respiratório e urogenital; aumento na capacidade de absorção de diferentes minerais, efeito benéfico no metabolismo de carboidratos e de lipídios e redução do risco de câncer de cólon¹⁸.

A absorção de minerais como o cálcio e ferro se dá através da diminuição do pH intestinal. O aumento na absorção de cálcio, em particular, reduz o risco de osteoporose, uma vez que este mineral promove um aumento na densidade e massa óssea^{19,20}.

Outro benefício que resulta da transformação de lactose em galactooligossacarídeos é o seu consumo por pessoas tolerantes a lactose. Muitas pessoas em todo mundo sofrem com problemas gastrintestinais por causa do elevado índice de lactose nos produtos de leite, doença conhecida como intolerância à lactose²¹. Pessoas com intolerância à lactose não conseguem digerir lactose, por conta da quantidade inadequada da enzima lactase. A deficiência ontogenética de lactase (DOL) é frequente na população brasileira, a incidência em brasileiros varia de 46 a 67%, dependendo

da etnia. Quando diagnosticada, pessoas intolerantes podem consumir produtos fermentados derivados de leite, produtos isentos de lactose, cápsulas de lactase após a ingestão de lactose ou a adição de lactase líquida no produto contendo lactose. Alimentos contendo microrganismos probióticos e ingredientes prebióticos estão sendo desenvolvidos atualmente, garantido atenuação dos efeitos à intolerância à lactose²².

6 Produção, Purificação e Identificação de GOS

Lactose, o principal carboidrato do leite é solúvel em água, sua solubilidade aumenta com o aumento de temperatura, cristalizando-se ao esfriar, quando em soluções concentradas. Tem um sabor menos adocicado em comparação com os outros açúcares (sacarose, glicose), reage com as proteínas do leite ou soro, escurecendo-as (reações de Maillard)²³. A lactose pode ser hidrolisada pela β-Galactosidase, a qual a transforma em glicose e galactose^{22,24,26}.

Quando utilizada na indústria alimentícia a β-galactosidase garante alimentos com baixo teor de lactose melhorando a solubilidade e digestibilidade do leite e derivados²⁷.

As galactosidases podem originar-se de diferentes fontes tais como: pêssego, amêndoa, rosas selvagens; organismos animais como intestino, cérebro e tecido da pele; leveduras como *Kluyveromyces lactis*, *K. fragillis* e *Candida pseudotropicalis*; bactérias como *Escherichia coli*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Bacillus* sp e *Streptococcus lactis* e fungos como *Aspergillus foetidus*, *A. niger*, *A. oryzae* e *A. phoenecis*^{13,28,29}. Entretanto, quando tais fontes da enzima são comparadas, as fontes microbiológicas são as mais importantes para a área tecnológica³⁰.

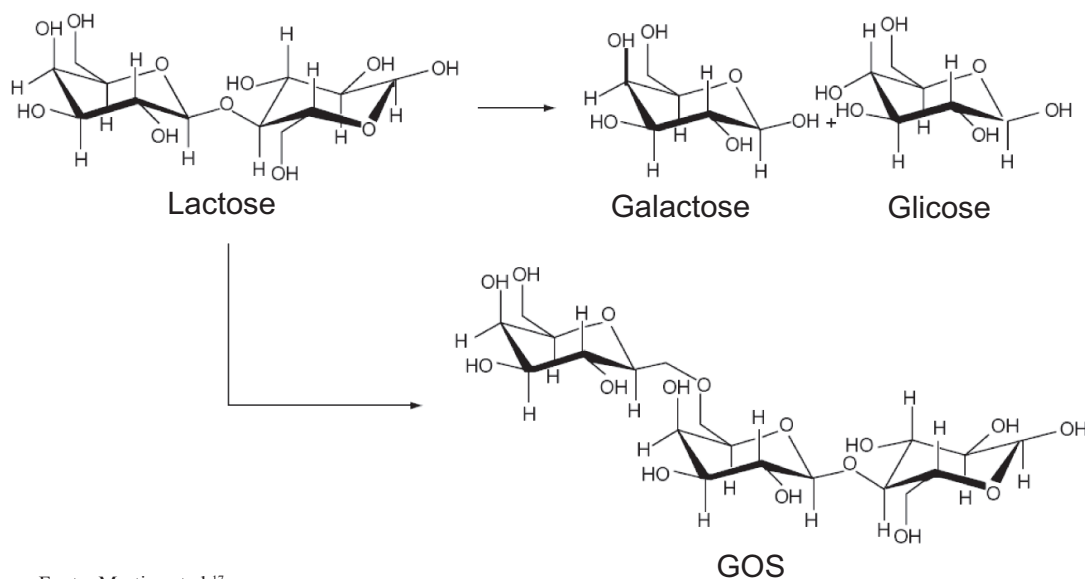
A enzima β-galactosidase é produzida intracelularmente por bactérias e leveduras, sendo necessária autólise das células utilizando solventes orgânicos para a liberação da enzima para o meio reacional, e excretada por fungos, facilitando sua separação do meio^{31,32}. Para o uso em alimentos nem todas as fontes de β-galactosidase são aceitáveis. Enzimas extraídas de *A. niger*, *A. oryzae* e *Saccharomyces* sp (*lactis* ou *fragillis*) são consideradas seguras devido aos numerosos estudos realizados e seu histórico de aplicação³³.

Galactooligossacarídeos podem ser produzidos pela reação entre lactose e β-galactosidase conhecida como transgalactosilação e os subprodutos obtidos são glicose e galactose^{34,35}. A reação ocorre pela transferência do resíduo de açúcar que forma a porção glicona da molécula do substrato para outra molécula de lactose. Quando a transferência é feita para a água, a reação é de hidrólise³⁶.

A hidrólise catalítica da lactose é uma reação direta e a síntese de oligossacarídeos (transgalactosilação) é a reação reversa. A transgalactosilação poderá ser favorecida com alta concentração de lactose, temperatura elevada e baixa

atividade de água no meio reacional. A hidrólise da lactose pode ser favorecida com baixa concentração de lactose e enzima imobilizada¹¹.

Para uma síntese efetiva de galactooligosacarídeos, além das condições ambientais como temperatura, pH e concentração do substrato, a preparação de β -galactosidases termicamente estáveis e com alta atividade de transgalactosilação deve ser desenvolvida³⁰. Os principais produtos da reação são trissacarídeos, 4'- ou 6'-galactosil-lactose, e poucos oligossacarídeos consistindo de quatro ou mais unidades de monossacarídeos, além de grande quantidade de dissacarídeos transgalactosilados^{5,37}.



Fonte: Martins et al.¹⁷

Figura 1: Conversão da lactose em galactooligosacarídeos por β -galactosidase

Na transgalactosilação, a água pode ser considerada como fator desfavorável para a síntese de GOS. Em sistemas aquosos, esta desvantagem pode ser atenuada com o aumento da concentração de lactose³⁹.

Para a síntese de GOS pode ser utilizada lactose pura ou soro de queijo como fonte de lactose. Proteínas e minerais podem ter efeito inibitório sobre a atividade da enzima e conseqüentemente na formação de oligossacarídeos. Segundo Chen et al.³⁴ o mecanismo de inibição causado pelas proteínas do leite é ainda desconhecido, mas constitui a principal causa da baixa produção de oligossacarídeos no leite e soro. Cátions como Mg^{+2} , Ca^{+2} , Zn^{+2} e Na^{+} podem ativar ou inibir a enzima, dependendo da sua origem.

Para Rustom et al.⁴⁰ o rendimento de GOS, atinge valores máximos no início de síntese enzimática, decrescendo em seguida. Este comportamento reflete o fato de que glicose e galactose, ao atingirem certo nível de concentração, atuam como inibidores para a formação de oligossacarídeos a partir da lactose.

7 Mecanismo da Reação de Transgalactosilação

Na reação de transgalactosilação para a obtenção de GOS, a primeira etapa é a formação do complexo enzima-galactosil e a liberação simultânea da glicose. Na segunda etapa, o complexo enzima-galactosil é transferido a um aceptor que contém um grupo hidroxila. Quando em solução diluída de lactose, a água é mais competitiva como aceptor que outros açúcares tais como glicose e lactose, a galactose é formada e liberada do sítio ativo. Em solução com elevada concentração de lactose, a molécula de lactose tem mais possibilidades de agir como aceptor, ligando com o complexo enzima-galactose para formar oligossacarídeos³⁸.

8 Condições para Formação de GOS

Os primeiros relatos da produção de GOS são da década de 50, onde foram produzidas quatro tipos de GOS usando β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* e três usando β -galactosidase de *E. coli*^{41,70,71}.

Diversos trabalhos apontam para correlação entre a transgalactosilação, a concentração inicial de lactose e a fonte da enzima. Poucos trabalhos apresentam uma síntese de GOS com mais de 40% de rendimento. A maioria das sínteses apresenta produção de GOS entre 20 e 25%⁴¹.

Nos trabalhos analisados o rendimento de GOS foi de 13 a 31% a partir de enzimas de leveduras em pH acima de 6,3 e temperatura entre 35 e 50°C. Quando foram utilizados fungos, a produção de GOS foi de 17 a 32% em pH entre 4,5 e 6,5 e temperatura entre 40 e 55°C. Pelo menos três trabalhos citam que a produção de GOS foi de 60 a 64% a partir das enzimas bacterianas em pH 4,5 a 6,0 e temperatura 60°C (Tabela 2).

Tabela 2: Condições para formação de GOS a partir de β -galactosidase de leveduras, bactérias e fungos

Fonte da enzima	pH	Temp. °C	Lactose inicial (g.L ⁻¹)	Máx. produção GOS %	Referência
Leveduras					
<i>Saccharomyces fragilis</i>	6,2	35	500	21,2	Roberts <i>et al.</i> apud Manucci ⁴¹
<i>Kluyveromyces maxianus</i> var. <i>lactis</i> OE-20	7,0	40	200	13	Kim <i>et al.</i> ⁴²
<i>Kluyveromyces lactis</i>	6,5	50	250	14,05	Martínez-Villaluenga <i>et al.</i> ⁴³
<i>Kluyveromyces lactis</i> .	6,5	50	400	31	Sanz Valero ¹¹
Bactérias					
<i>Saccharopolyspora rectivirgula</i>	7	70	600	41	Nakao <i>et al.</i> ⁴⁴
<i>Sterigmatomyces elviae</i>	5,0	60	200	63	Onishi <i>et al.</i> ⁴⁵
<i>Thermus aquaticus</i> YT-I.	6,0	70	160	35	Berger <i>et al.</i> ⁴⁶
<i>Rhodotorula minuta</i>	6,0	60	200	64	Onishi <i>et al.</i> ⁴⁷
<i>Sterigmatomyces elviae</i>	4,5	60	360	60	Onishi <i>et al.</i> ⁴⁸
<i>Thermus</i> sp. Z-1	7	70	300	43	Akiyama <i>et al.</i> ³⁶
<i>Escherichia coli</i>	6,7	37	220	29,7	Chen <i>et al.</i> ⁴⁹
<i>Bullera singularis</i> KCTC 75	5	50	180	5	Cho <i>et al.</i> ⁵⁰
<i>Thermotoga maritima</i>	6	80	500	39	Ji <i>et al.</i> ⁵¹
<i>Bifidobacterium bifidum</i> NCIMB 41171	6,8	40	400	43	Goulas <i>et al.</i> ⁵²
<i>Bifidobacterium longum</i> BCRC 157	6,8	45	400	30,1	Hsu <i>et al.</i> ⁵³
<i>Bacillus circulans</i>	6,0	40	400	40	Sanz Valero ¹¹
Fungos					
<i>Aspergillus niger</i>	4,5	45	250	-	Wierzbicki <i>et al.</i> ⁵⁴
<i>Aspergillus niger</i>	4,5	45	200	18,9	Kim <i>et al.</i> ⁵⁵
<i>Aspergillus oryzae</i>	4,5	40	400	32	Iwasaki <i>et al.</i> ⁵⁶
<i>Penicillium simplicissimum</i>	6,5	50	600	30,5	Cruz <i>et al.</i> ⁵⁷
<i>Scopulariopsis SP</i>	5,5	45	400	22,6	Almeida ⁵⁸
<i>Aspergillus oryzae</i>	4,5	55	200	17	Gaur <i>et al.</i> ⁵⁹
<i>Penicillium expansum</i> F3	5,4	50	380	28,7	Li <i>et al.</i> ⁶⁰
<i>Aspergillus Oryzae</i>	4,5	37	400	25	Sanz Valero ¹¹
<i>Aspergillus oryzae</i>	4,5	40	500	26	Neri ⁶¹

9 Métodos de Separação e Purificação de GOS

Os galactooligossacarídeos podem ser separados utilizando várias técnicas. Na utilização de carvão ativado os açúcares em solução aquosa são adsorvidos no carvão e desorvidos seletivamente com soluções de etanol³⁵.

Hernandez⁶² (2009) utilizou carvão ativado na separação de GOS, onde a eluição com 10% de etanol mostrou ser um método rápido para obter uma quantidade considerável de GOS (em níveis grama) de alta pureza, sem a presença de mono e dissacarídeos como lactose.

A separação também pode ser realizada por cromatografia por exclusão, sendo a filtração em gel utilizando Sephadex (dextrana) ou Bio-Gel P-2 (gel de poliácridamida) as mais utilizadas. Hernandez⁶² também avaliou a separação de GOS por esta técnica e obteve um alto rendimento, chegando a 92% de recuperação.

Segundo Sanz Valero¹¹, resinas de troca catiônica vêm sendo amplamente utilizadas na indústria do açúcar para diferentes tipos de separação. A utilização de resinas de troca catiônica, juntamente com a água como eluente resulta em

melhor separação dos sacarídeos do que quando trocadores aniônicos são utilizados. A utilização da resina de troca catiônica Dowex 50W-X4 (K⁺) utilizando água como eluente se mostrou satisfatório na separação de açúcares, onde um grande número de sacarídeos foram separados, incluindo oligossacarídeos, tendo-se recuperações superiores a 95 %.

Montañés *et al.*¹³, utilizaram a técnica do fluido supercrítico para a purificação de GOS. Foi utilizado dióxido de carbono e uma mistura etanol/ água como eluente para separar uma mistura comercial contendo GOS, mono e dissacarídeos. A separação dos carboidratos ocorreu devido ao diferente grau de polimerização.

10 Métodos de Identificação e Quantificação de GOS

Os métodos cromatográficos são instrumentos adequados para analisar as complexas composições de galactooligossacarídeos, obtidos a partir da enzima β -galactosidase⁶³. São citadas as técnicas: cromatografia em papel, cromatografia em camada delgada, cromatografia líquida de alta eficiência e cromatografia gasosa⁶⁴.

Alguns dos fatores que propiciam a utilização destas técnicas são: a alta seletividade, eficiência, capacidade de carga da fase estacionária e velocidade do processo¹¹.

A cromatografia em papel, apesar de ser uma técnica rústica, tem sido utilizada há muitos anos para a identificação preliminar dos oligossacarídeos. Este método tem boa capacidade de separar oligossacarídeos pelo seu tamanho, onde o menor *rf* (fator de retenção) está relacionado com o aumento do peso molecular. Entretanto, a quantificação é frequentemente imprecisa em comparação a outros métodos cromatográficos⁵⁸.

Vários autores empregam a cromatografia em papel para acompanhamento da formação de galactooligossacarídeos. Santos⁶⁵, utilizou o método descendente e sistema de solvente acetato de etila, álcool isopropílico e água na proporção 6:3:1 (v/v). Toba et al.⁶⁶, trabalharam com cromatografia em papel por método ascendente, utilizaram como eluente uma solução de butanol piridina água em uma proporção de 6:4:3 (v/v).

Os cromatogramas podem ser revelados com difenilamina-anilina-ácido fosfórico, seguido de aquecimento em estufa a 100°C. Este revelador em alta temperatura propicia o surgimento de coloração azul ou verde a amarelo com diferentes intensidades. As manchas de colorações azuladas indicam ligações β -1,4 e em ligações β -1,6 coloração de verde a amarelo. Outro revelador utilizado é a solução de hidrogênio anilina ftalato, revelador específico para carboidratos^{58,66}.

A cromatografia em camada delgada (CCD) também pode ser utilizada na identificação preliminar de GOS durante seu processo de formação. Nesta técnica é utilizado sílica gel como fase estacionária e como fase móvel, variadas misturas de eluentes, como, butanol/etanol/água (5:3:2 v/v) ou uma mistura contendo ácido acético clorofórmio água em diferentes proporções. A visualização dos GOS pode ser realizada por revelador específico para carboidratos e a confirmação se dá pela comparação do *rf* utilizando padrão de GOS, como por exemplo, 4'galactosil-lactose⁶⁷.

Wierzbicki e Kosikowski⁵⁴ identificaram a formação de oligossacarídeos em meio contendo lactose somente através de cromatografia em camada delgada, sendo utilizado como fase móvel n-butanol ácido acético éter água (9:6:3:1) e utilizaram como revelador benzidina/ácido acético em ácido tricloroacético dissolvido em etanol, esta solução revela monossacarídeos e oligossacarídeos através de manchas amarelas em luz natural e verde sobre ondas UV.

Devido o surgimento de novas técnicas cromatográficas para identificação de carboidratos, a utilização de CCD se tornou pouco viável. A técnica de CLAE aprimorou as colunas cromatográficas e os sistemas de detecção de carboidratos, sendo esta técnica atualmente a mais utilizada para a identificação e quantificação destes compostos.

Quanto às técnicas de cromatografia líquida, o sistema

CLAE-IR (cromatografia líquida de alta eficiência - detector de índice de refração) é o método mais comum para identificação e quantificação de sacarídeos, entretanto apresenta algumas desvantagens, tais como: técnica não seletiva, pouca sensibilidade na separação dos compostos a serem identificados. Ao contrário do sistema CLAE-IR, o CLAE-PAD (cromatografia líquida de alta eficiência-detector de pulso amperométrico) é o sistema que oferece mais vantagens, principalmente em relação à sensibilidade do detector, pois detecta compostos em nível de picomoles. Neste sistema é utilizado um detector de pulso amperométrico (PAD) equipado com eletrodo de ouro, sendo este muito seletivo. Os derivados de polissacarídeos são ácidos fracos e podem ser separados pelo controle de pH da fase móvel^{63,68}. Este tipo de detector é específico para componentes contendo grupos funcionais ionizáveis como, por exemplo, hidroxilas, aminas e grupos sulfídricos. Os ácidos carboxílicos e espécies inorgânicas não interferem neste tipo de detector².

Em relação às colunas cromatográficas, a de exclusão molecular e a resina de troca iônica são as mais utilizadas.

Almeida³⁵ identificou e quantificou galactooligossacarídeos produzidos de *Scopulariopsis* sp a partir da lactose através de análise por CLAE, utilizando uma coluna de exclusão molecular, sendo usado água como eluente. Os carboidratos foram identificados e quantificados por cromatografia líquida, utilizando o detector de índice de refração em comparação com o tempo de retenção dos padrões de glicose, galactose, lactose e 4'galactosil-lactose.

A cromatografia de exclusão por tamanho é uma técnica que se aplica particularmente a espécies de alto peso molecular, os carboidratos são identificados através da utilização de padrões, os galactooligossacarídeos eluídos, que não possuem padrão, podem ser classificados quando eluídos antes do trissacarídeo 4'galactosil-lactose, indicando serem de maior peso molecular.

As resinas de troca iônica também são utilizadas em larga escala na identificação dos GOS, como nos trabalhos de Lisboa² e de Martens e Frankenberger⁶⁸ nos quais utilizaram coluna de troca aniônica CarboPac PA-1 (Dionex, 250 × 4 mm) e detector eletroquímico operando na forma de pulso amperométrico (CLAE-PAD) para a identificação de galactooligossacarídeos. O eluente geralmente utilizado é uma mistura de hidróxido de sódio e acetato de sódio, podendo ser empregado de forma isocrática ou em gradiente.

Colunas utilizadas por Adameczak et al.⁶⁹ e Chen et al.⁴⁹ contendo NH₂ como forma iônica, utiliza uma mistura de acetonitrila e água como eluente. A retenção dos analitos se dá devido à troca iônica entre as hidroxilas dos GOS e os componentes iônicos da coluna, os GOS ficam altamente retidos nesse tipo de coluna. Nestes trabalhos a identificação de GOS foi realizada através de um CLAE-IR.

A cromatografia gasosa (CG) é uma técnica de identificação de carboidratos menos utilizada. A separação por cromatografia gasosa requer, primeiramente, a metilação dos açúcares. A análise e identificação dos picos são complexas devido à separação dos anômeros, a menos que sejam primeiramente reduzidos². Hernandez et al.⁶² utilizaram a técnica de cromatografia gasosa para quantificar GOS derivatizados, fracionados a partir de várias técnicas.

Carboidratos possuem hidroxilas polares e grupos carbonila que requerem a conversão para um estado volátil, através de derivatização, para que seja desenvolvida a análise por cromatografia gasosa. O método de Hakomori (método de permetilação) é um tipo de método de derivatização, que consiste na substituição de todos os grupos hidroxila disponível, por grupos metílicos, utilizando como reagente o iodeto de metila⁶³.

11 Conclusão

Os efeitos benéficos dos galactooligosacarídeos à saúde têm sido estudados desde a década de 50, e é atribuído ao aumento de bifidobactérias no intestino grosso.

As principais fontes de β -galactosidase utilizadas para a produção de GOS são leveduras, bactérias e fungos, sendo as leveduras menos utilizadas devido à produção enzimática ser intracelular, dificultando a liberação da mesma para o meio reacional.

As condições reacionais para a produção de GOS variam dependendo da fonte enzimática, pH, temperatura e concentração de lactose. Sendo que a produção máxima encontrada na literatura para produção de GOS utilizando como fonte enzimática as leveduras, foi de 31% de GOS para *Kluveromyces lactis* em pH 6,0; temperatura de 50 °C e concentração inicial de lactose de 400 g/L. Quando bactérias foram utilizadas como fonte enzimática, garantiu-se uma maior produção de GOS (64%) utilizando a bactéria *Rhodotorula minuta* em pH 6,0; temperatura de 60°C e concentração inicial de lactose de 200 g/L. Quando fungos foram utilizados como fonte enzimática, as melhores condições de produção (32%) foram pH 4,5; temperatura de 40°C e concentração inicial de lactose de 400 g/L utilizando *Aspergillus oryzae*.

Com o avanço das técnicas cromatográficas a identificação de GOS está se tornando cada vez mais eficaz. A cromatografia líquida de alta eficiência é a mais utilizada atualmente por ser mais sensível e seletiva. As colunas mais utilizadas são de troca iônica e de exclusão molecular e os detectores de índice de refração (IR) e de fluxo amperométrico, sendo o primeiro utilizado mais frequentemente apesar de ser menos seletivo que o PAD.

As técnicas de separação de GOS importantes para a qualidade, pureza e rendimento na recuperação de GOS para sua utilização como fonte de prebióticos.

Referências

1. Pereira Filho D, Furlan SA. Prevalência de intolerância à lactose em função da faixa etária e do sexo: experiência do laboratório Dona Francisca, Joinville (SC). Rev Saúde Amb 2004;5(1):24-30.
2. Lisboa CR. 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.
3. Crittenden RG, Playne MJ. Production, properties and applications of food-grade oligosaccharides. Trends Food Sci Technol 1996;7:353-61.
4. Alander M, Matto J, Kneifel W, Johansson M, Kogler B, Crittenden R et al. Effect of galacto-oligosaccharide supplementation on human faecal microflora and on survival and persistence of *Bifidobacterium lactis* Bb-12 in the gastrointestinal tract. Int Dairy J 2001;11:817-25.
5. Macfarlane GT, Steed H, Macfarlane S. Bacterial metabolism and health-related effects of galacto-oligosaccharides and other prebiotics. J Appl Microb 2008;104:305-44.
6. Delzenne NM, Roberfroid MR. Physiological effects of nondigestible oligosaccharides. LebWissen Technol 1994;27:1-6.
7. Rupérez P. Bifidogenic oligosaccharides. Food Sci Technol Int 1998;4(4):237-43.
8. Passos LM, Park YK. Frutooligosacarídeos: implicações na saúde humana e uso em alimentos. Ciênc Rural 2003;33(2):385-90.
9. Tunland BC, Meyer D. Nondigestible oligo- and polysaccharides (dietary fiber): their physiology and role in human health and food. Comprehensive Reviews Food Sci Food Safety 2002;1(3):90-109.
10. Sako T, Matsumoto K, Tanaka R. Recent progress on research and applications of non-digestible galactooligosaccharides. Int Dairy J 1999;9(1):69-80.
11. Sanz Valero JI. Production of galacto-oligosaccharides from lactose by immobilized β -galactosidase and posterior chromatographic separation. Tese [Doutorado em Engenharia Química e Biomolecular] - Ohio State University; 2009.
12. Saad SMI. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. Braz J Pharmaceutical Sci 2006;42:1-16.
13. Montañés F, Olano A, Reglero G, Ibañez E, Fornari T. Supercritical technology as an alternative to fractionate prebiotic galactooligosaccharides. Sep Purif Technol 2009;66(2):383-9.
14. Mitsuoka T. Bifidobacteria and their role in human health. J Ind Microbiol 1990;6:263-8.
15. Morishita Y, Oowada T, Ozaki A, Mizutani T. Galactooligosaccharide in combination with *Bifidobacterium* and *Bacteroides* affects the population of *Clostridium perfringens* in the intestine of gnotobiotic mice. Nutr Res 2002;22:1333-41.
16. Bielecka M, Biedrzycka E, Majkowska A, Juskiewicz J, Wroblewska M. Effect of non-digestible oligosaccharides on gut microecosystem in rats. Food Res Int 2002;35:39-44.

17. Martins AR, Burkert CAV. Revisão-Galactooligossacarídeos (GOS) e seus efeitos prebióticos e bifidogênicos. *Braz J Food Technol* 2009;12(3):230-40.
18. Mussatto SI, Mancilha IM. Non-digestible oligosaccharides: a review. *Carbohydrate Pol* 2007;68:587-97.
19. Rivero-Urgell M, Santamaria-Orleans A. Oligosaccharides: application in infant food. *Early Hum Dev* 2001;65(S2):S43-S52.
20. Van Den Heuvel EGHM, Schoterman MHC, Muijs T. Transgalactooligosaccharides stimulate calcium absorption in postmenopausal women. *J Nutr* 2000;130:2938-42.
21. Curda L, Rudolfová J, Stetina J, Dryák B. Dried buttermilk containing galactooligosaccharides - process layout and its verification. *J Food Eng* 2006;77:468-71.
22. Cunha MET, Suguimoto HH, Oliveira NA, Sivieri K, Costa MR. Intolerância à lactose e alternativas tecnológicas. *UNOPAR Cient Ciênc Biol Saúde* 2008;10(2):83-8.
23. Bobbio PA, Bobbio FO. Introdução a química de alimentos. São Paulo: Varela; 1992.
24. ALM L. Effect of fermentation on lactose, glucose, and galactose content in milk and suitability of fermented milk products for lactose intolerant individuals. *Dairy Sci* 1982;65:346-52.
25. Montgomery RK, Buller HA, Rings EH, Grand RJ. Lactose intolerance and the genetic regulation of intestinal lactase-phlorizin hydrolase. *FASEB J* 1991;5:2824-31.
26. Pray WS. Lactose intolerance: the norm among the world's peoples. *Am J Pharma Educ* 2000;64:205-6.
27. Santiago PA, Marquez LDS, Cardoso VL, Ribeiro EJ. Estudo da produção de β -galactosidase por fermentação de soro de queijo com *Kluyveromyces marxianus*. *Ciênc Tecnol Aliment* 2004;24(4):567-72.
28. Longo G. Influência da adição de lactase na produção de iogurtes. Dissertação [Mestrado em Tecnologia de Alimentos] - Universidade Federal do Paraná; 2006.
29. Cardelle-Cobas A, Corzo N, Villamiel M, Olano A. Isomerization of lactose-derived oligosaccharides: a case study using sodium aluminate. *J Agric Food Chem* 2008;56:10954-9.
30. Mahoney RR. Galactosyl-oligosaccharide formation during lactose hydrolysis: a review. *Food Chemisfry* 1998;63(2):147-54.
31. Silva ME, Franco TT. Purification of microbial b-galactosidase from *kluyveromyces fragilis* by bioaffinity partitioning. *Rev Microbiol* 1999;30:324-31.
32. Oliveira CCM. Produção de β -galactosidase por Levedura Recombinante –Desenvolvimento de um Sistema de Produção Estável. Dissertação [Mestrado em Biotecnologia] - Universidade do Minho; 2008.
33. Carminatti CA Ensaio de hidrólise enzimática da lactose em reator a membrana utilizando beta-galactosidase de *Kluyveromyces lactis*. Dissertação [Mestrado em Engenharia Química] - Universidade Federal de Santa Catarina; 2001.
34. Chen CS, Hsu CK, Chiang BH. Optimization of the enzymic process for manufacturing low-lactose milk containing oligosaccharides. *Process Biochem* 2002;38:801-8.
35. Almeida MM. Síntese de galactooligossacarídeos por B-galactosidase de *Scopulariopsis sp* a partir da lactose. Tese (Doutorado em Ciência em Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos - Universidade Estadual de Campinas; 2003.
36. Akiyama K, Takase M, Horikoshi K, Okonogi S. Production of galactooligosaccharides from lactose using a beta-glucosidase from *Thermus sp* Z-1. *Biosci Biotechnol Biochem* 2001;65(2):438-41.
37. Matsumoto K, Kobayashi Y, Ueyama S, Watanabe T, Tanaka R, Kan T et al. Oligosaccharides: production, properties and applications. *Gordon Breach Sci* 1990;90-106.
38. Zhou QZK, Chen XD. Effects of temperature and pH on the catalytic activity of the immobilized β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. *Bioch Eng J* 2001;9:33-40.
39. Chen SX, Wei DZ, Hu ZH. Synthesis of galactooligosaccharides in AOT/isooctane reverse micelles by b-galactosidase. *J Mol Catal B Enzym* 2001;16:109-14.
40. Rustom I, Foda M, Lopez-Leiva MH. Formation of oligosaccharides from whey UF-permeate by enzymatic hydrolysis-analysis of factors. *Food Chem* 1998;62(2):141-7.
41. Manucci F. Enzymatic synthesis of galactooligosaccharides from whey permeate. 2009. Dissertação [Mestrado] - School of Food Science & Environmental Health, Dublin Institute of Technology; 2009.
42. Kim J, Lee D, Lee J. Production of galactooligosaccharide by beta-galactosidase from *Kluyveromyces marxianus var lactis* OE-20. *Biotechnol Bioprocess Eng* 2001;6:337-40.
43. Martinez-Villaluenga C, Cardelle-Cobas A, Corzo N, Olano A. Study of galactooligosaccharide composition in commercial fermented milks. *J Food Compos Anal* 2008;21:540-4.
44. Nakao M, Harada M, Kodama Y, Nakayama T, Shibano Y, Amachi T. Purification and characterization of a thermostable /3-galactosidase with high transgalactosylation activity from *Saccharopolyspora rectivirgula*. *Appl Microbiol Biotechnol* 1994;40:657-63.
45. Onishi N, Tanaka T. Purification and properties of a novel thermostable galacto-oligosaccharide-producing b-galactosidase from *sterigmatomyces elviae* CBS8119. *Appl Environmental Microbiol* 1995;61(11):4026-30.
46. Berger JL, Lee BH, Lacroix C. Immobilization of β -galactosidase from *Thermus Aquaticus* YT-1 for oligosaccharides synthesis. *Biotechnol Lett* 1995;9:601-6.
47. Onishi N, Yokozeki K. Gluco-oligosaccharide and galacto-oligosaccharide production by *Rhodotorula minuta*. IFO879. *J Ferment Bioeng* 1996;82(2):124-7.
48. Onishi N, Tanaka T. Galacto-oligosaccharide production using a recycling cell culture of *Sterigmatomyces elviae* CBS8119. *Lett Appl Microbiol* 1998;26(2):136-9.
49. Chen CW, Ou-Yang C-C, Yeh C-W. Synthesis of galactooligosaccharides and transgalactosylation modeling in reverse micelles. *Enzyme Microb Technol* 2003;33: 497-507.
50. Cho Y-J, Shin HJae, Bucke C. Purification and biochemical properties of a galactooligosaccharide producing β -galactosidase from *Bullera singularis*. *Biotechnol Lett* 2003;25:2107-11.

51. Ji ES, Park NH, Oh DK. Galacto-oligosaccharide production by a thermostable recombinant b-galactosidase from *Thermotoga maritima*. *World J Microbiol Biotechnol* 2005;1:759-64.
52. Goulas A, Tzortzis G, Gibson GR. Development of a process for the production and purification of a- and b-galactooligosaccharides from *Bifidobacterium bifidum* NCIMB 41171. *Int Dairy J* 2007;17:648-56.
53. Hsu CA, Lee SL, Chou CC. enzymatic production of galactooligosaccharides by α -galactosidase from *bifidobacterium longum* BCRC 15708. *J Agric Food Chem* 2007;55:2225-30.
54. Wierzbicki LE, Kosikowski FV. Formation of oligosaccharides during b-galactosidase action on lactose. *J Dairy Sci* 1972;56(11):1400-04.
55. Kim CR, Lee SR, Lee YK. Formation of galactooligosaccharides by the partially purified β -galactosidase from *Aspergillus niger* CAD 1. *Hanguk Chuksan Hakhoechi* 1990;32:323-3.
56. Iwasaki K, Nakajima M, Nakao S. Galacto-oligosaccharide production from lactose by an enzymatic batch reaction using β -Galactosidase. *Process Biochem* 1996;31:69-76.
57. Cruz R, D'Arcadia Cruz V, Belote JG, Oliveira Khenayfes MDC, Santos Oliveira LH, Ardiles E. et al. Production of transgalactosylated oligosaccharides (TOS) by galactosyltransferase activity from *Penicillium simplicissimum*. *Braz Bioresour Technol* 1999(2):165-71.
58. Almeida MM, Pastore GM. Açúcares funcionais galactooligosacarídeos. Produção de galactooligosacarídeos por b-galactosidase utilizando metodologia de superfície de resposta. *Biotechnol Cienc Desenvol* 2004;33:10-4.
59. Gaur R, Pant H, Jain R, Khare SK. Galacto-oligosaccharide synthesis by immobilized *Aspergillus oryzae* b-galactosidase. *Food Chem* 2006;97:426-30.
60. Li ZY, Xiao M, Lu LL, Li YM. Production of non-monosaccharide and high-purity galactooligosaccharides by immobilized enzyme catalysis and fermentation with immobilized yeast cells. *Process Biochem* 2008;43:896-900.
61. Neri DF. Immobilization of B-galactosidase onto different water insoluble matrices. Tese [Doutorado em Engenharia Química e Biológica] - Universidade do Minho; 2008.
62. Hernández O, Ruiz-Matute AI, Olano A, Moreno FJ, Sanz ML. Comparison of fractionation techniques to obtain prebiotic galactooligosaccharides. *Int Dairy J* 2009;19:531-6.
63. Lee VSY. The use of crude cell extracts of lactic acid bacteria optimized for betagalactosidase activity to form galactooligosaccharides with lactose, mannose, fucose, and N-acetylglucosamine. Dissertação [Mestrado em Agricultural, Food, and Nutritional Sciences] - University of Alberta; 2009.
64. Dias LG, Veloso ACA, Correia DM, Rocha O, Torres D, Rocha I et al. UV spectrophotometry method for the monitoring of galacto-oligosaccharides production. *Food Chem* 2009;113:246-52.
65. Santos R. Produção de Galactooligosacarídeo por lactase fúngica. Dissertação [Mestrado em Engenharia de Alimentos] - Universidade Estadual de Campinas; 2006.
66. Toba T, Tomita Y, Itoh T, Adachi S. B-Galactosidases of lactic acid bacteria: characterization by oligosaccharides formed during hydrolysis of lactose. *J Dairy Sci* 1981;64(2)324-31
67. Rabiú BA, Jay AJ, Gibson GR, Rastall RA. Synthesis and fermentation properties of novel galacto- oligosaccharides by b-galactosidases from *bifidobacterium* species. *Appl Environmental Microbiol* 2001;67:2526-30.
68. Martens, D. A.; Frankenberger, W. T. Determination of saccharides in biological materials by high-performance anion- exchange chromatography with pulsed amperometric detection. *J Chromatogr* 1991;546:297-309.
69. Adamczak M, Charubin D, Bednarski W. Influence of reaction medium composition on enzymatic synthesis of galactooligosaccharides and lactulose from lactose concentrates prepared whey permeate. *Cheml Papers* 2009;63:111-6.
70. Aronson M. Transgalctosylation during lactose hidrólisis. *Arch Biochem* 1952;39:370
71. Pazur JH. The mechanism of enzymatic synthesis of galactosyl oligosaccharides. *J Biol Chem* 1954;208:439.

