

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS

**Imobilização de β -galactosidase de *Bacillus circulans* em
macroesferas de quitosana para a produção de lactosacarose**

LOVAINE SILVA DUARTE

PORTO ALEGRE

2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS

**Imobilização de β -galactosidase de *Bacillus circulans* em
macroesferas de quitosana para a produção de lactosacarose**

LOVAINE SILVA DUARTE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Assinatura do Orientador

PORTO ALEGRE

2016

CIP - Catalogação na Publicação

Duarte, Lovaine Silva

Imobilização de beta-galactosidase de *Bacillus circulans* em macroesferas de quitosana para a produção de lactosacarose / Lovaine Silva Duarte. -- 2016.

67 f.

Orientador: Plinho Francisco Hertz.

Coorientador: Eliseu Rodrigues.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Porto Alegre, BR-RS, 2016.

1. Imobilização enzimática. 2. Prebiótico. 3. Transgalactosilação. 4. beta-galactosidase. 5. Quitosana. I. Hertz, Plinho Francisco, orient. II. Rodrigues, Eliseu, coorient. III. Título.

Lovaine Silva Duarte
Farmacêutica – UFRGS

DISSERTAÇÃO

Submetida como parte dos requisitos para obtenção do grau de

MESTRE EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA)

Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Porto Alegre, RS, Brasil.

Aprovada em:

Pela Banca Examinadora:

Homologada em:

Por:

Plinho Francisco Hertz
Orientador – PPGCTA/UFRGS

Profa. Dra. Rosane Rech
Coordenadora do Programa de
Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia
de Alimentos (PPGCTA) –UFRGS

Prof. Dr. Adriano Brandelli
Banca - UFRGS - Porto Alegre

Prof. Dr. Vitor Manfro
Diretor do Instituto de Ciência e
Tecn. Alimentos - ICTA/UFRGS

Profa. Dra. Daniele Misturini Rossi
Banca - UFRGS – Porto Alegre

Profa. Dra. Giandra Volpato
Banca - IFRS - Porto Alegre

Porto Alegre, 31 de março de 2016

DEDICATÓRIA

Ronaldo

*“A ti não necessitaria escrever;
seriam seus a dedicatória,
o prólogo
as linhas, os pontos finais, vírgulas,
acentos e
o resto.
O todo.
Pois sem ti não haveria o verbo,
Amor.”*

AGRADECIMENTOS

Deixo aqui meus sinceros agradecimentos:

Ao meu orientador, Prof. Dr. Plinho Hertz, pelo acolhimento em seu laboratório, ensinamentos, compreensão e otimismo. Fica aqui registada a minha eterna gratidão.

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Eliseu Rodrigues, pelos conhecimentos transmitidos, pela disponibilidade, dedicação e pela infinita paciência que sempre teve.

Ao Prof. Dr. Rafael Rodrigues por todo o apoio, disponibilidade e por sua preciosa colaboração na realização deste trabalho.

Aos colegas dos laboratórios de Biotecnologia, Bioprocesso e Biocatálise (BBB), pelo auxílio e amizade ao longo deste projeto.

A todos amigos que conquistei neste período, em especial à Jéssie, à Gicele, à Carla e ao André pela grande ajuda e amizade.

Aos professores e funcionários do ICTA que de alguma forma ajudaram no desenvolvimento deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES pelo auxílio financeiro.

E finalmente a minha família: minha mãe Marlisa, meu filho Arthur e ao meu marido Ronaldo pelo apoio, incentivo e compreensão. Sem vocês nada disso seria possível!

"O valor de praticar com rigor, por algum tempo, uma ciência rigorosa não está propriamente em seus resultados: pois eles sempre serão uma gota ínfima, ante o mar das coisas dignas de saber. Mas isso produz um aumento de energia, de capacidade dedutiva, de tenacidade; aprende-se a alcançar um fim de modo pertinente. Nesse sentido é valioso, em vista de tudo o que se fará depois, ter sido um homem de ciência."

Nietzche (1878)

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| RESUMO | 9 |
| ABSTRAT | 10 |
| OBJETIVO GERAL | 11 |
| OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 11 |
| 1 INTRODUÇÃO | 12 |
| 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 14 |
| 2.1 Oligossacarídeos..... | 14 |
| 2.2 Prebióticos..... | 15 |
| 2.3 Lactosacarose | 17 |
| 2.3.1 Enzimas produtoras de lactosacarose | 18 |
| 2.3.2 β -galactosidase | 20 |
| 2.3.2.1 Reações catalisadas por β -galactosidase | 21 |
| 2.4 Enzimas Imobilizadas..... | 24 |
| 2.4.1 Adsorção física | 25 |
| 2.4.2 Ligação covalente | 26 |
| 2.4.3 Encapsulamento..... | 26 |
| 2.4.4 Entrecruzamento | 27 |
| 2.5 Suportes para imobilização de enzimas..... | 27 |
| 2.5.1 Suportes à base de quitosana..... | 28 |
| Referências | 30 |
| 3. RESULTADOS | 39 |
| A new bioprocess for the production of prebiotic lactosucrose by a immobilized β -galactosidase | |
| ABSTRACT | 41 |
| 1. INTRODUCTION | 42 |
| 2. MATERIALS AND METHODS | 43 |
| 2.1. Materials..... | 43 |
| 2.2. Enzymatic activity | 44 |
| 2.3. Chitosan support preparation | 44 |
| 2.4. Enzyme immobilization..... | 45 |
| 2.5. Thermal stability | 45 |

| | |
|---|-----------|
| 2.6. Effects of the pH and temperature on the synthesis of lactosucrose | 46 |
| 2.7. Enzymatic synthesis of oligosaccharides | 48 |
| 2.8. Operational stability of immobilized β -galactosidase for lactosucrose synthesis | 48 |
| 2.9. Identification of oligosaccharides by HPLC-MS ⁿ | 48 |
| 2.10. Quantification of carbohydrates by HPLC-RID | 49 |
| 3. RESULTS AND DISCUSSION | 50 |
| 3.1. Effect of protein loading on the enzyme immobilization..... | 50 |
| 3.2. Thermal stability | 51 |
| 3.4. Kinetics of lactosucrose and oligosaccharides synthesis | 56 |
| 4. CONCLUSIONS | 59 |
| REFERENCES | 60 |
| SUPPLEMENTARY MATERIAL | 64 |
| CONSIDERAÇÕES FINAIS | 66 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1 - Estrutura química da lactosacarose | 18 |
| Figura 2 - As reações enzimáticas de β -frutofuranosidase obtida a partir de <i>Arthrobacter</i> sp. K-1 com lactose e sacarose como substratos..... | 19 |
| Figura 3 - O mecanismo proposto para produção de lactosacarose por levansacarase de <i>Bacillus Natto</i> | 19 |
| Figura 4 - Esquema da síntese de lactosacarose e seus análogos por β -galactosidase de <i>Bacillus circulans</i> com lactose e sacarose como substratos | 20 |

RESUMO

Neste trabalho foi desenvolvido um novo bioprocesso para a síntese de lactosacarose, um candidato a prebiótico. A lactosacarose foi produzida por transgalactosilação, catalisada pela β -galactosidase de *Bacillus circulans* imobilizada em macroesfera de quitosana, utilizando a lactose e a sacarose como substratos. No processo de imobilização, os resultados indicam que a melhor razão entre a concentração de enzima e de suporte foi de 200 mg.g⁻¹. A estabilidade térmica da enzima imobilizada foi determinada e comparada com a estabilidade térmica da enzima livre em temperaturas de 50, 60 e 70 °C e para esta última foi verificada a estabilidade na presença e ausência de substrato. A imobilização aumentou de 10 a 260 vezes a estabilidade térmica da enzima, sendo este efeito inversamente relacionado com a temperatura. A otimização das condições de produção indica, para a β -galactosidase imobilizada e livre, que a melhor condição de produção de lactosacarose e de oligossacarídeos totais, ocorre na temperatura de 30 °C e pH 7,0. Nesta condição, após 24 h, foi alcançada a produção de 79 g.L⁻¹ de lactosacarose, 35 g.L⁻¹ de galacto-oligossacarídeos (GOS) e 260 g.L⁻¹ de oligossacarídeos totais. O processo de imobilização possibilitou a reutilização da enzima imobilizada por 30 ciclos, mantendo aproximadamente 95% da concentração inicial de lactosacarose, GOS e oligossacarídeos totais produzidos inicialmente. Portanto, o bioprocesso de imobilização de β -galactosidase de *Bacillus circulans* em macroesfera de quitosana pode ser considerado um potencial catalisador para produção industrial de lactosacarose.

ABSTRAT

This work developed a new process for the synthesis of lactosucrose, a candidate for prebiotic. The lactosucrose was produced by transgalactosylation that was catalyzed by a *Bacillus circulans* β -galactosidase immobilized on macrospheres of chitosan using lactose and sucrose as substrates. In the process of immobilization, the results indicate that the best ratio of the concentration of enzyme and carrier was 200 mg.g⁻¹. The thermal stability of the immobilized enzyme was determined and compared with the thermal stability of the free enzyme at temperatures of 50, 60 and 70 °C and for the latter was verified stability in the presence and absence of substrate. The immobilization increased (10-260 times) the thermal stability of the enzyme, which is inversely related to the temperature. The results of the experiment optimization of lactosucrose production conditions indicate point out that, for free and immobilized β -galactosidase, the best condition lactosucrose production and total oligosaccharides occurs at a temperature of 30 °C and pH 7.0. In this condition, after 24 h, producing 79 g.L⁻¹ lactosucrose was reached, 35 g.L⁻¹ galactooligosaccharides (GOS) and 260 g.L⁻¹ of total oligosaccharides. The immobilization process enabled the reuse of immobilized enzyme for 30 cycles, maintaining approximately 95% of the initial concentration of lactosucrose, GOS and total oligosaccharides produced initially. Therefore, the bioprocess of β -galactosidase from *Bacillus circulans* immobilization on macrospheres of chitosan can be considered a potential catalyst for industrial

OBJETIVO GERAL

Produzir lactosacarose a partir de lactose e sacarose como substratos utilizando enzima imobilizada.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Imobilizar β -galactosidase em macropartículas de quitosana;
- Determinar a estabilidade térmica da enzima livre, imobilizada e em presença de substrato;
- Verificar as melhores condições de temperatura e pH para a produção de lactosacarose, GOS e oligossacarídeos totais;
- Determinar a estabilidade operacional da enzima imobilizada.

1 INTRODUÇÃO

Os oligossacarídeos são carboidratos de baixa massa molecular e de baixo grau de polimerização contendo de 3 a 10 resíduos de monossacarídeos em sua estrutura química (IUP-IUPAC, 1982). Os oligossacarídeos não digeríveis representam uma fração considerável desta classe de compostos. Como não são digeridos pelos seres humanos, chegam ao intestino grosso, onde podem ser fermentados por bactérias residentes. Alguns destes oligossacarídeos não digeríveis são classificados como prebióticos. Os prebióticos são definidos como ingredientes seletivamente fermentados que permitem mudanças específicas na composição e/ou atividade da microbiota gastrointestinal, conferindo, com isso, bem-estar e benefício à saúde (ROBERFROID, 2007). Para que seja considerado um prebiótico há necessidade de demonstração científica de que o ingrediente: (1) resiste à acidez gástrica, a hidrólise por enzimas de mamíferos e a absorção gastrointestinal; (2) seja fermentado pela microbiota intestinal; (3) estimule seletivamente o crescimento e/ou atividade de bactérias intestinais associadas com a saúde e o bem-estar (RASTALL e GIBSON, 2006).

Os prebióticos podem ser obtidos por síntese (química ou enzimática) ou por hidrólise de polissacarídeos (métodos físicos, químicos ou enzimáticos). A síntese catalisada por enzimas representa uma alternativa atraente aos métodos químicos clássicos por permitir o controle da regioseletividade e da estereoquímica dos produtos finais da reação (PERUGINO *et al.*, 2004). Por exemplo, os fruto-oligossacarídeos (FOS) podem ser obtidos a partir da sacarose por transfrutossilacção usando as β -frutofuranosidases (PASSOS e PARK, 2003); a produção de isomalto-oligossacarídeos, tais como a panose, envolve a reação catalisada por transglicosilação pela β -glicosidase utilizando amido como substrato (FERNANDEZ-ARROJO *et al.*, 2007). As β -galactosidases também catalisam reações de transgalactosilação que têm como produto final galacto-oligossacarídeos (GOS), atuando na hidrólise da lactose e na síntese de oligossacarídeo a partir do mesmo substrato (RABIU *et al.*, 2001; TZORTZIS *et al.*, 2005). A lactosacarose pode ser produzida através da reação de transfrutossilacção por β -frutofuranosidase (C.E. 3.2.1.26) de *Arthrobacter* sp. K-1 ou uma série de levansacarases (C.E. 2.4.1.10), ou, ainda, por reação de transgalactosilação, catalisada por β -galactosidases (C.E.

3.2.1.23) obtida de *Bacillus circulans*, utilizando sacarose e lactose como substratos (MU *et al.*, 2013b)

Os processos de síntese enzimática citados acima são realizados principalmente pela utilização de enzimas livres (MU *et al.*, 2013b; TONOZUKA *et al.*, 2012). Em geral, as enzimas são caras, aumentam substancialmente o custo do processo e possuem baixa resistência as condições de processo (ILLANES, 2011). Com a imobilização em suportes, estas podem ser reutilizadas diversas vezes, o que diminui os custos. Além disso, enzimas imobilizadas tendem a ser mais estáveis podendo ser usadas em processos contínuos (GARCIA-GALAN *et al.*, 2011). Portanto, a imobilização pode ser a chave para a otimização do desempenho operacional de uma enzima em processos industriais (SHELDON, 2007).

Na literatura existem diversos estudos descrevendo a produção dos prebióticos fruto-oligossacarídeos (FOS) e galacto-oligossacarídeos (GOS) por enzimas imobilizadas em suportes. Porém, praticamente não há trabalhos relatando a produção de lactosacarose por enzimas imobilizadas. O trabalho de (MIKUNI *et al.*, 2000), onde uma β -frutofuranosidase de *Arthrobacter* sp. foi imobilizada sobre resina é a única referência disponível na literatura sobre o uso de uma enzima imobilizada para a produção de lactosacarose. Além disso, não consta registro de nenhuma β -galactosidase usada de forma imobilizada para produção deste oligossacarídeo. Neste sentido, este trabalho tem como objetivo a síntese de lactosacarose (O- β -D-galactopiranosil-(1,4) -O- α -D-glicopiranosil(1,2) - β -D-frutofuranosídeo) usando uma β -galactosidase de *Bacillus circulans* imobilizada em macroesferas de quitosana.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 OLIGOSSACARÍDEOS

Os oligossacarídeos são carboidratos de baixa massa molar contendo entre 3 a 10 resíduos de monossacarídeos em sua estrutura química (IUP-IUPAC, 1982), embora alguns autores definam oligossacarídeos como moléculas contendo de 2 a 20 unidades monossacarídicas (FENNEMA, 2010). Os oligossacarídeos são encontrados naturalmente em diversos alimentos, tais como na banana, alho, cebola, leite, mel, alcachofra, etc. Eles são componentes importantes dos alimentos, influenciando diretamente seu valor nutricional e suas características sensoriais (MORENO e SANZ, 2014).

Entre os oligossacarídeos, destacam-se os oligossacarídeos não digeríveis (NDOs). Os NDOs possuem ligações químicas entre as unidades monossacarídicas que, em geral, não são hidrolisadas pela acidez do estômago e/ou pelas enzimas digestivas do trato gastrointestinal superior dos seres humanos. Alguns NDOs são hidrolisados apenas por enzimas produzidas por grupos específicos e limitados de micro-organismos do cólon, principalmente pelas bifidobactérias e lactobacilos (BIELECKA *et al.*, 2002; PASSOS e PARK, 2003; RODRIGUEZ-COLINAS *et al.*, 2013).

A produção de NDOs está atraindo o interesse da indústria de alimentos para utilização como ingredientes com propriedades funcionais (MORENO e SANZ, 2014). Além da extração vegetal, os oligossacarídeos podem ser obtidos através de síntese (química ou enzimática) ou da hidrólise de polissacarídeos (métodos físicos, químicos ou enzimáticos) (GIESE *et al.*, 2011; GULEWICZ *et al.*, 2000). Entretanto, sua síntese é complexa devido ao grande número de combinações entre as unidades monoméricas de monossacarídeos e a introdução estereo-específica de ligações glicosídicas (BARRETEAU *et al.*, 2006; TOLSTOGUZOV, 1991).

Os procedimentos físicos são menos utilizados pois não apresentam seletividade e não são específicos. Os métodos mais comuns envolvem mudanças drásticas de pH e temperatura, uso de micro-ondas ou ultrassom (BEKERS *et al.*, 2005). Por exemplo, o uso de ultrassom e micro-ondas em pH 1,5 provocou a

hidrólise da xilana, extraída de sementes de tamarindo, resultando em xilo-oligossacarídeos (VODENICAROVA *et al.*, 2006). Outro método relatado na literatura é o uso de radiação de energia ionizante (AL-ASSAF *et al.*, 2006).

Alguns métodos químicos podem ser utilizados na síntese de oligossacarídeos, destacando-se as reações de condensação (com o inconveniente do alto preço e baixo rendimento nas etapas de separação e purificação) e a hidrólise ácida em altas temperaturas (podendo ocorrer a formação de furfural (pentoses) ou hidroximetilfurfural (hexoses)) (AKPINAR *et al.*, 2009). Com a hidrólise ácida e altas temperaturas, (JOHANSSON *et al.*, 2006), obtiveram oligossacarídeos com ligações β -(1 \rightarrow 3), alternadas por ligações β -(1 \rightarrow 4) utilizando β -glicanas extraídas de cereais como aveia e cevada.

O uso de enzimas é uma alternativa aos métodos físicos e químicos para a síntese de oligossacarídeos por permitir o controle da regioesletividade e da estereoquímica dos produtos finais da reação (PERUGINO *et al.*, 2004). Dentre as reações enzimáticas utilizadas na obtenção de oligossacarídeos destacam-se as reações catalisadas por glicosidases e glicosiltransferases (KLEIN *et al.*, 2012; MONSAN e PAUL, 1995; SHODA *et al.*, 1998). As glicosiltransferases participam tanto de reações de transferência intramolecular como de transferência intermolecular. Para uso comercial, estas enzimas são produzidas principalmente por fungos, leveduras e bactérias, e podem ser utilizadas como biocatalisadores livres ou imobilizados (ABE *et al.*, 2003; WATANABE *et al.*, 2006). Como exemplos de reações catalisadas pelas glicosiltransferases destaca-se a produção de fruto-oligossacarídeos (FOS) pela ação da frutossiltransferase sobre a sacarose (GHAZI *et al.*, 2005; WATANABE *et al.*, 2006). As β -galactosidases catalisam reações de transgalactosilação que geram como produto final galacto-oligossacarídeos (GOS), atuando na hidrólise da lactose e síntese do oligossacarídeo a partir do mesmo substrato (RABIU *et al.*, 2001; TZORTZIS *et al.*, 2005).

2.2 PREBIÓTICOS

Alguns oligossacarídeos não digeríveis (NDOs), tais como a inulina, os FOS e os GOS, são considerados prebióticos. Prebiótico eram definidos como

“ingrediente alimentar não digerível que afeta benéficamente o hospedeiro ao estimular seletivamente o crescimento e/ou atividade de uma ou de um número limitado de bactérias no cólon, melhorando assim a saúde do hospedeiro” (GIBSON e ROBERFROID, 1995). Esta definição foi atualizada, não restringindo o cólon como o único local de ação do prebiótico, definindo-o, então, como um “ingrediente seletivamente fermentado que permite mudanças específicas na composição e/ou atividade da microbiota gastrointestinal, conferindo, com isso, bem-estar e benefício à saúde” (FIGUEROA-GONZALEZ *et al.*, 2011; ROBERFROID, 2007).

Para ser classificado como prebióticos esses ingredientes devem cumprir alguns requisitos fundamentais. Conforme (ROBERFROID, 2007):

- a) Resistir ao ácido clorídrico do estômago, resistir a ação hidrolítica das enzimas intestinais e não serem diretamente absorvidos pelo trato gastrintestinal,
- b) Ser fermentados por bactérias potencialmente benéficas do cólon, principalmente bifidobactérias e lactobacilos,
- c) Estimular seletivamente a proliferação de bactérias associadas com a saúde e bem-estar.

A hipótese de que os NDOs são fermentados por bactérias que colonizam o intestino grosso é apoiada por muitos estudos *in vitro* (analíticos e microbiológicos) e *in vivo* que também confirmam a produção de ácido lático e ácidos carboxílicos de cadeia curta como produtos finais da fermentação. Foi demonstrado em humanos que esta fermentação leva à estimulação seletiva do crescimento de bifidobactérias (GIBSON *et al.*, 2004).

Os gêneros bacterianos *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* são os mais seletivamente estimulados pelos prebióticos (RODRIGUEZ-COLINAS *et al.*, 2013). Estudos têm mostrado que a ingestão de prebióticos pode reduzir a prevalência e duração da diarreia infecciosa e associada a antibióticos; reduzir a inflamação e sintomas associados com a doença inflamatória do intestino; exercer efeitos de proteção para prevenir o câncer de cólon; melhorar a biodisponibilidade e absorção de minerais, incluindo cálcio, magnésio, e, possivelmente, de ferro; diminuir alguns fatores de risco para as doenças cardiovasculares e promover a saciedade e perda de peso, além de prevenir a obesidade (GIBSON e ROBERFROID, 1995;

GOURBEYRE *et al.*, 2011; KLEIN *et al.*, 2012; LORENZONI *et al.*, 2014; OOI e LIONG, 2010; SALMINEN *et al.*, 2004; SLAVIN, 2013). Os prebióticos também possuem baixo valor calórico, baixa cariogenicidade e baixo índice glicêmico (CRITTENDEN e PLAYNE, 1996). Por este motivo, estão sendo adicionados em bebidas, produtos lácteos, iogurtes probióticos, (GIBSON *et al.*, 2004), sobremesas (sorvetes, geleias, gelatinas, etc.), biscoitos, chocolates, doces, cereais matinais, pães, pastas enriquecidas (VORAGEN, 1998).

Nos últimos anos, aumentou o interesse das pessoas em consumir oligossacarídeos prebióticos e, conseqüentemente, ocorreu um aumento na produção de novos oligossacarídeos com ação prebiótica para utilização em alimentos funcionais (ROLIM, 2015).

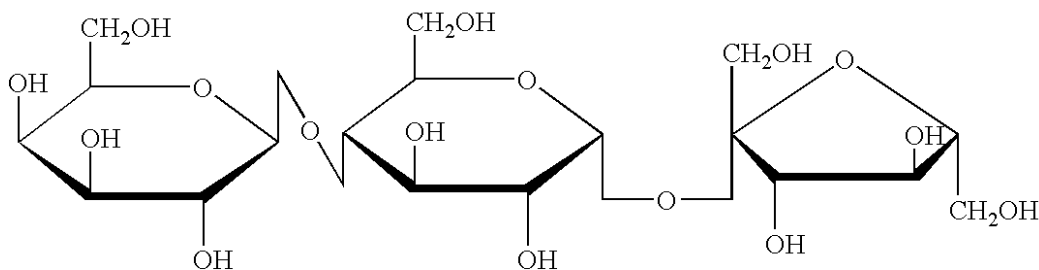
A inulina, os fruto-oligossacarídeos (FOS), obtidos a partir de sacarose, os galacto-oligossacarídeos (GOS) e a lactulose, obtidos a partir de lactose, são classificados como prebióticos e foram extensivamente estudados (CHO e FINOCCHIARO, 2009; GIBSON *et al.*, 2010; KLEIN *et al.*, 2012; LORENZONI *et al.*, 2014). NDOs ainda estão sendo estudados e não estão incluídos no grupo dos prebióticos. Aqueles com maior destaque são: isomalto-oligossacarídeos (IMO) (RUDEEKULTHAMRONG *et al.*, 2013) xilo-oligossacarídeos (XOS) (MOURA *et al.*, 2007) e lactosacarose (CHO e FINOCCHIARO, 2009; DIEZ-MUNICIO *et al.*, 2014; GIBSON *et al.*, 2010).

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) é quem regula a categoria de “Alimentos com Alegações de Propriedade Funcional e/ou de Saúde” através da Resolução nº 18/1999. A legislação brasileira ainda não aprova o uso do termo prebiótico e incluem a inulina, os FOS e a lactulose na lista de “fibras alimentares que auxiliam o funcionamento do intestino”.

2.3 LACTOSACAROSE

A lactosacarose (O- β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 4)-O- α -D-glicopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β -D-frutofuranosídeo) (**Figura 1**), é um trissacarídeo sintético obtido a partir de uma mistura de lactose (β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 4)- α -D-glucose) e sacarose (α -D-glicopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β -D-frutose) por transgalactosilação enzimática.

Figura 1 - Estrutura química da lactosacarose



Fonte: Kazufumi Ensuiko Sugar Refining Co. Ltd. (2007)

A lactosacarose é um oligossacarídeo hidrolisado em baixa extensão por enzimas digestivas humanas (FUJITA *et al.*, 1991) mas utilizada seletivamente por bactérias probióticas (FUJITA *et al.*, 1991; MIZOTE *et al.*, 2009; OHKUSA *et al.*, 1995). Assim, a lactosacarose é um candidato a prebiótico. Estudos adicionais são necessários para comprovar que a lactosacarose preenche todos os critérios para ser considerado um prebiótico (CHO e FINOCCHIARO, 2009; GIBSON *et al.*, 2010).

A comercialização de lactosacarose recebeu interesse particular no Japão, onde esta foi incluída na lista de alimentos para usos específicos de saúde (FOSHU) em 2005, sendo Ensuiko Sugar Refining e Hayashibara Shoji os dois maiores fabricantes.

2.3.1 Enzimas produtoras de lactosacarose

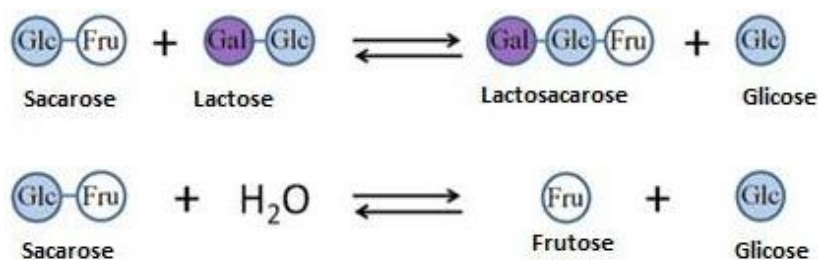
A lactosacarose é um oligossacarídeo raro, difícil de ser sintetizada quimicamente (MU *et al.*, 2013a).

Três enzimas diferentes têm potencial para serem utilizadas como biocatalisadores na síntese enzimática de lactosacarose, conforme (SILVERIO *et al.*, 2015): levansacarase, β -frutofuranosidases e β -galactosidase. A levansacarase é obtida de diferentes fontes de micro-organismos, tais como *Bacillus Natto*, *Bacillus subtilis* e *Paenibacillus polymyxa*. A β -frutofuranosidase é geralmente obtida a partir de *Arthrobacter* sp. e a β -galactosidase é geralmente obtida a partir de *Bacillus circulans*.

A enzima β -frutofuranosidase (E.C. 3.2.1.26) catalisa a transfrutosição a partir da sacarose para moléculas aceptoras de lactose. Embora a β -

frutofuranosidase ocorra amplamente na natureza, até o presente momento apenas a β -frutofuranosidase de *Arthrobacter* sp. K-1 possui capacidade de conversão de lactose e sacarose em lactosacarose (MU *et al.*, 2013a). (**Figura 2**)

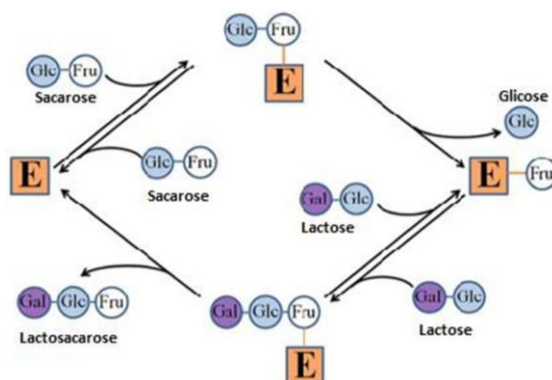
Figura 2 - As reações enzimáticas de β -frutofuranosidase obtida a partir de *Arthrobacter* sp. K-1 com lactose e sacarose como substratos



Fonte: Adaptado de PILGRIM *et al.* (2001)

Em relação a levansacarase (E.C. 2.4.1.10), quando a lactose e a sacarose são utilizadas como aceptor e doador de transfrutossil, respectivamente, sugere-se que a formação de lactosacarose é realizada pelo mecanismo de *ping-pong* envolvendo a formação de um intermediário transitório enzima-frutossil (**Figura 3**) (FUJITA *et al.*, 1991).

Figura 3 - O mecanismo proposto para produção de lactosacarose por levansacarase de *Bacillus* Natto

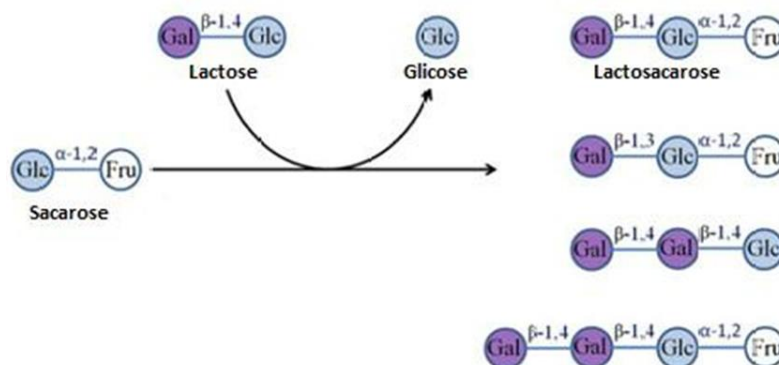


Fonte: Adaptado de FUJITA *et al.* (1991)

Foi relatada a produção de lactosacarose por levansacarase de *Aerobacter levanicum* (AVIGAD, 1957). Vários anos mais tarde, muitos micro-organismos com atividade levansacarase foram rastreados e caracterizados com capacidade de bioconversão de lactose e sacarose em lactosacarose, tal como *Bacillus Natto* (TAKAHAMA *et al.*, 1991), *Bacillus subtilis* ATCC 6501 (HARA *et al.*, 1994), *Bacillus subtilis* CCCM 32835 (PARK *et al.*, 2005), *Paenibacillus polymyxa* IFO 3020 (CHOI *et al.*, 2004), *Sterigmatomyces selviae* ATCC 18894 (LEE *et al.*, 2007), e *Pseudomonas aurantiaca* (HAN *et al.*, 2009; MU *et al.*, 2013b).

A enzima β -galactosidase de *B. circulans* catalisa a transferência de unidades de galactose para derivados de glicose e galactose, com formação de tri- e tetrassacarídeos com ligação β -1,4 incluindo lactosacarose (FARKAS *et al.*, 2003). Ao contrário da produção de lactosacarose por transfrutossilacção de β -frutofuranosidase de *Arthrobacter* sp. K-1 e de levansacarases, a produção de lactosacarose por β -galactosidase de *B. circulans* é devido à transferência do resíduo galactosil do doador lactose para o aceitador sacarose (**Figura 4**).

Figura 4 - Esquema da síntese de lactosacarose e seus análogos por β -galactosidase de *Bacillus circulans* com lactose e sacarose como substratos



Fonte: Adaptado de LI *et al.* (2009)

2.3.2 β -galactosidase

A enzima β -galactosidase (β -D-galactoside galactohidrolase, EC 3.2.1.23) pode ser obtida a partir de uma ampla variedade de fontes, tais como micro-organismos, plantas e animais (PANESAR *et al.*, 2010). As suas características e

propriedades variam de acordo com a fonte (GERMAN, 1997; MAHONEY, 1998). A β -galactosidase derivada de plantas e animais possui pouco valor comercial, mas aquelas obtidas de alguns micro-organismos possuem propriedades interessantes para aplicação tecnológica. Os micro-organismos oferecem várias vantagens em relação a outras fontes disponíveis, tais como fácil manuseio, maior taxa de multiplicação e alto rendimento de produção.

2.3.2.1 Reações catalisadas por β -galactosidase

A β -galactosidase é uma enzima da família das hidrolases que catalisa a hidrólise da ligação glicosídica da lactose em glicose e galactose (ADAM *et al.*, 2004). A enzima também é capaz de realizar reação de transferência (transgalactosilação) do resíduo galactosil com a formação de uma variedade de di-, tri-, e oligossacarídeos chamados de galacto-oligossacarídeos (GOS) (PARK e OH, 2010).

A origem da enzima determina o seu potencial de transgalactosilação e a sua capacidade de empregar moléculas diferentes como aceptores do resíduo galactosil. Além disso, a fonte da enzima determina a estrutura molecular de oligossacarídeos transgalactosilados: composição do produto, número de unidades de hexoses e os tipos de ligação entre eles (GUERRERO *et al.*, 2015):

- β -galactosidases de *A. oryzae* e *B. circulans* exibem alta atividade de transgalactosilação;
- Estirpes de *Kluyveromyces* exibem alta atividade hidrolítica, mas muito baixa atividade de transgalactosilação;

O mecanismo de ação da β -galactosidase envolve pelo menos três etapas, que permitem a hidrólise ou a atividade de transgalactosilação (WALLENFELS e MALHOTRA, 1961):

1° etapa: Enzima + Lactose \rightarrow Enzima-lactose

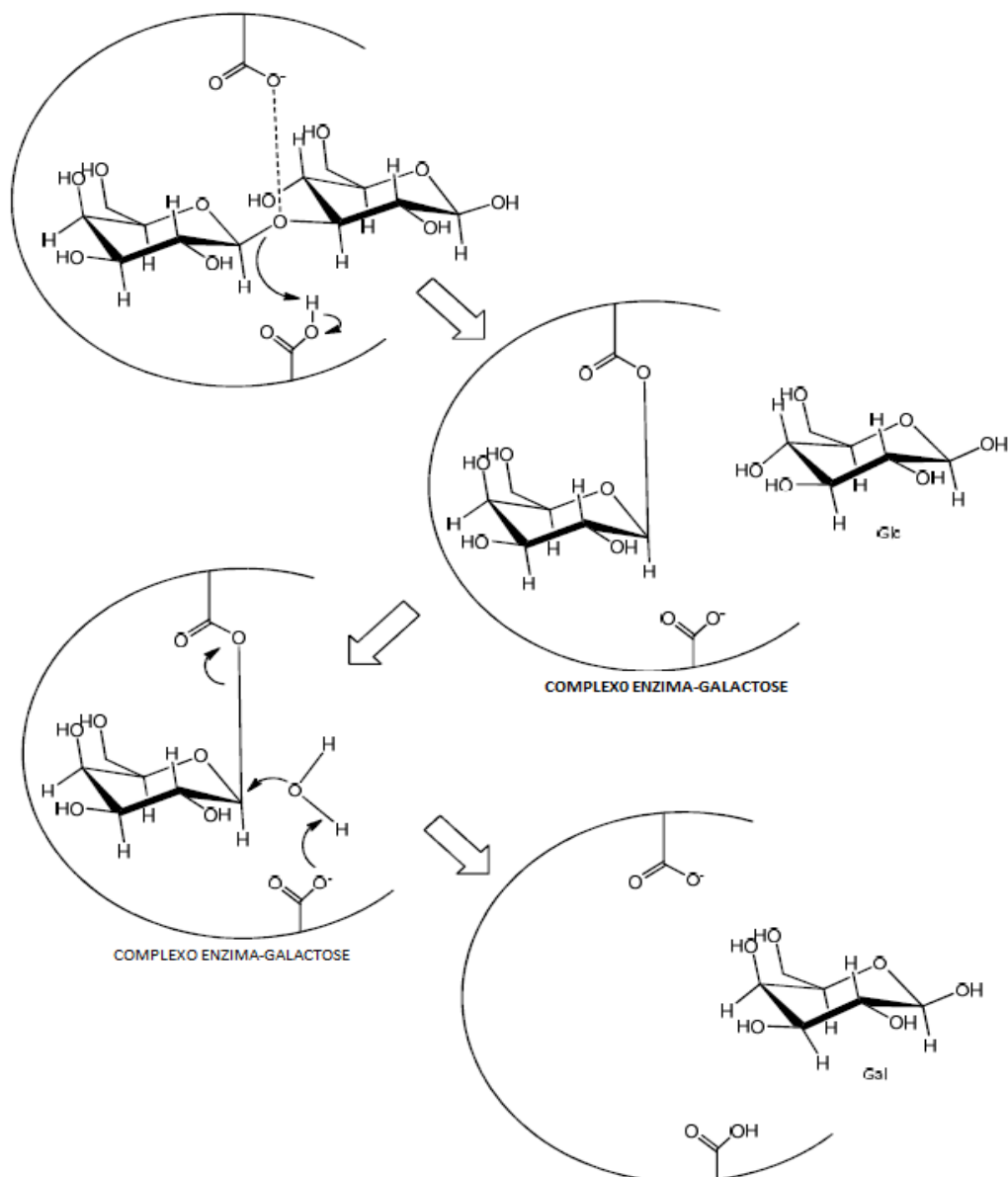
2° etapa: Enzima-lactose \rightarrow Galactosil-Enzima + Glicose

3° etapa: Galactosil-Enzima + Aceptor \rightarrow Galactosil Aceptor + Enzima

Dois resíduos de ácido glutâmico presentes no sítio ativo da enzima estão diretamente envolvidos no mecanismo catalítico, agindo, um como doador de prótons e o outro como base nucleofílica (WALLENFELS e MALHOTRA, 1961).

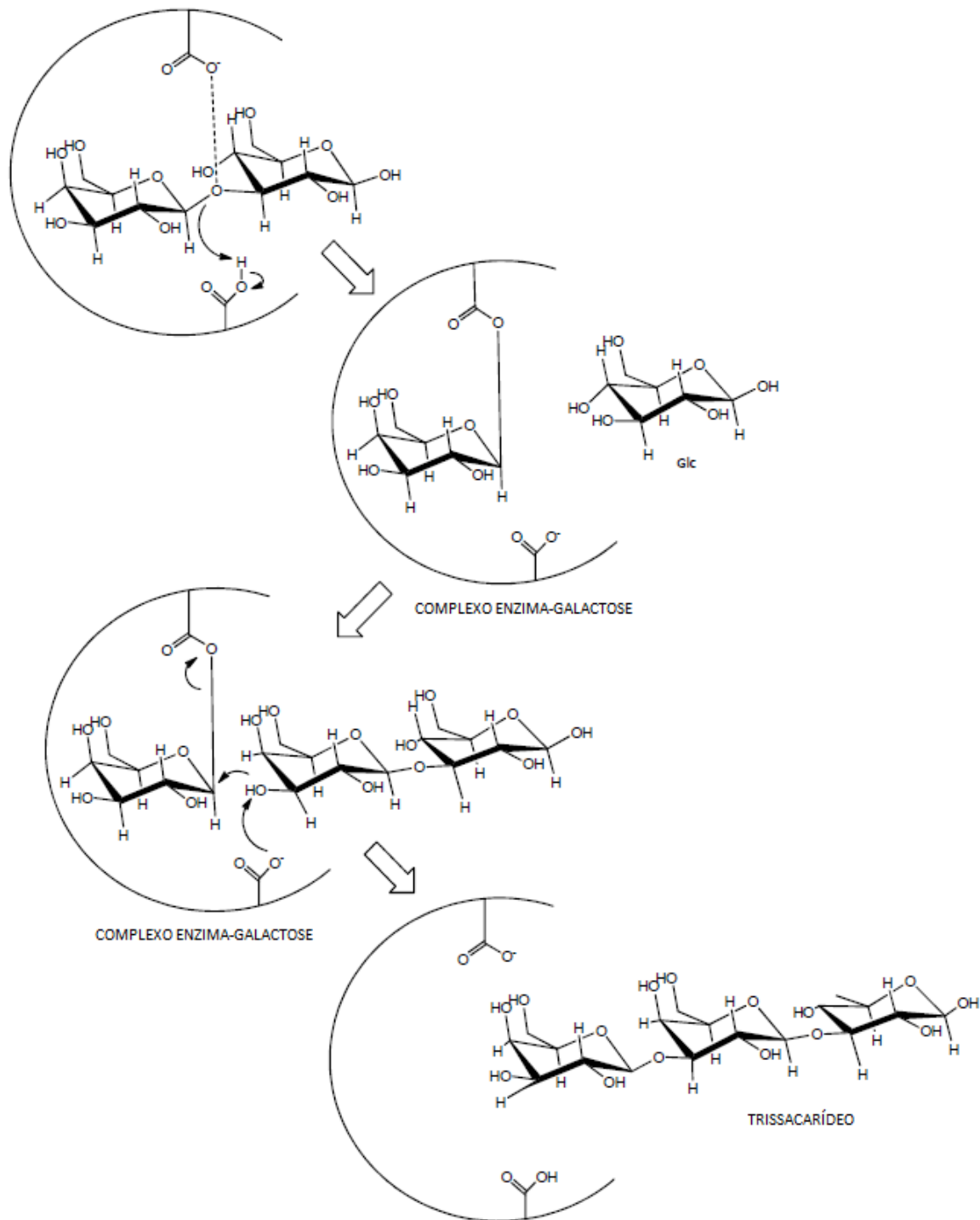
Duas situações podem ocorrer: (1) Quando o aceptor é água, uma molécula de galactose livre é formada por hidrólise (**Figura 5**), (2) Quando o aceptor é um açúcar, o resultado é a formação de galactosil-oligossacarídeo (**Figura 6**).

Figura 5 - Mecanismo de hidrólise da lactose pela β -galactosidase



Fonte: Adaptado de BENJAMINS (2014)

Figura 6 - Mecanismo de reação de transgalactosilação por β -galactosidase



Fonte: Adaptado de BENJAMINS (2014)

O mecanismo indica que a β -galactosidase irá transferir a galactose para aceptores nucleofílicos contendo um grupo hidroxila. A transferência para a água produz galactose livre; transferência para outro açúcar produz di-, tri- e

oligossacarídeos superiores. Estes, por sua vez, tornam-se substratos para a enzima e são lentamente hidrolisados. Foi observado que as reações de hidrólise e de transgalactosilação ocorrem simultaneamente, e a predominância de uma ou de outra é, em grande parte, função da concentração de lactose, da natureza da enzima usada e das condições de reação escolhidas (NERI, 2008).

O rendimento dos produtos de transgalactosilação de uma reação controlada cineticamente é independente da concentração de enzima. Já o tempo para atingir este rendimento, no entanto, é inversamente proporcional à concentração de enzima (KASCHE *et al.*, 1984).

Pela elevada atividade de transgalactosilação, a β -galactosidase de *Bacillus circulans* foi escolhida para realizar este estudo. A atividade de transgalactosilação de β -galactosidase de *Bacillus circulans* também foi aplicada à síntese de *N*-acetil-lactosamina, (BRIDIAU *et al.*, 2010) de GOS (FARKAS *et al.*, 2003; RODRIGUEZ-COLINAS *et al.*, 2012) e lactosacarose, (LI *et al.*, 2009), sendo este o primeiro estudo da produção de lactosacarose por β -galactosidase imobilizada.

2.4 ENZIMAS IMOBILIZADAS

Uma enzima é definida como imobilizada quando ela está fisicamente ligada ou retida em um suporte sólido sobre o qual passa um substrato que é convertido em produto. Este sistema enzima-suporte pode ser utilizado de forma repetida e contínua” (CHIBATA, 1978; GUIÓSÁN, 2006). Na década de 50 esta tecnologia foi, pela primeira vez, introduzida com a produção de preparações enzimáticas imobilizadas por inclusão em matrizes poliméricas e por ligação em suportes. Desde então, foram desenvolvidos numerosos métodos de imobilização em diferentes materiais e devido as suas vantagens sobre enzimas livres, seus derivados imobilizados são objetos de considerável interesse. Nos últimos cinco anos foram publicados mais de 11000 trabalhos sobre enzimas imobilizadas (pesquisa no Scopus utilizando o termo de busca “immobilized enzymes”).

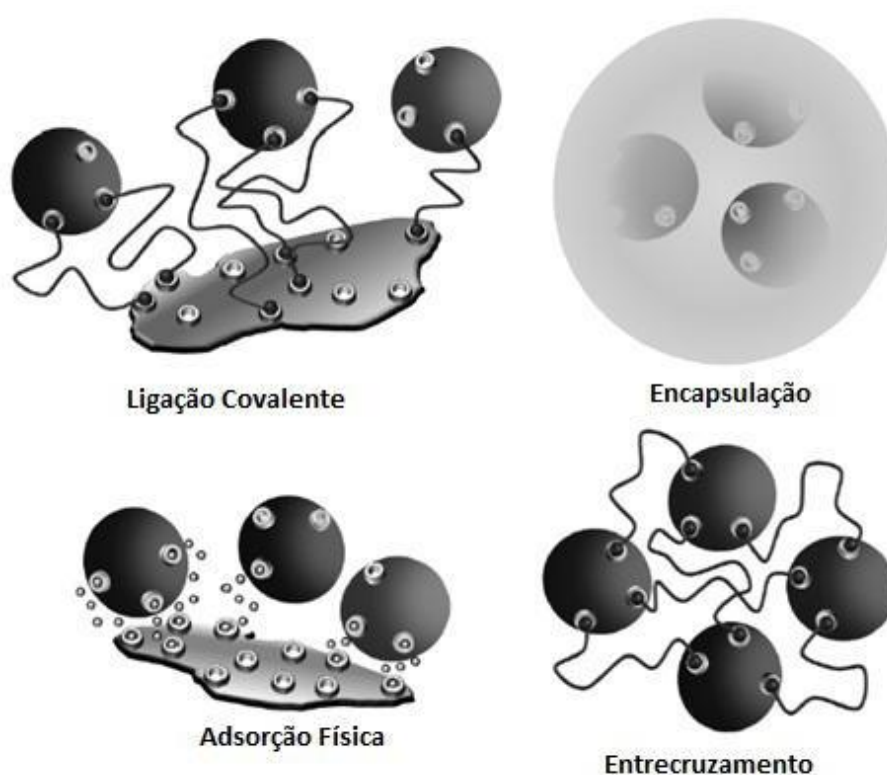
As enzimas imobilizadas possuem várias vantagens em relação às suas formas livres, tais como: possibilidade de reutilização da preparação enzimática, com redução no custo, possibilidade de utilização em processos contínuos e a fácil

separação da enzima dos produtos (SHELDON e VAN PELT, 2013). Além disso, a imobilização pode resultar no aumento da estabilidade da enzima frente ao pH, temperatura e tempo de armazenamento (ALBAYRAK e YANG, 2002).

Um processo eficiente de imobilização é afetado pelas características da enzima, do suporte e do método de imobilização (CANTONE *et al.*, 2013).

A imobilização de enzimas pode ser feita por diferentes métodos, tais como: (1) adsorção física, (2) ligação covalente, (3) encapsulamento e (4) entrecruzamento (**Figura 7**).

Figura 7 - Métodos de imobilização de enzimas



Fonte: Adaptado de BICKERSTAFF (1996)

2.4.1 Adsorção física

A adsorção física é uma das técnicas mais simples para a imobilização de enzimas na indústria (CAO, 2005). Ela está baseada nas interações fracas (pontes de hidrogênio, interações hidrofóbicas e de *van der Waals*) entre a enzima e o suporte (TANAKA e KAWAMOTO, 1999). Apesar da simplicidade da ligação por

interações fracas, este método é limitado pela tendência de dessorção da enzima do suporte e por ser sensível às condições do ambiente, como a temperatura e a concentração de íons no meio (GROSOVA *et al.*, 2008).

2.4.2 Ligação covalente

Nesse método as enzimas são ligadas covalentemente ao suporte através de grupos funcionais não essenciais para a sua atividade catalítica (TANAKA e KAWAMOTO, 1999). A enzima fica fortemente ligada ao suporte, evitando a sua separação do suporte durante a utilização. Além disso, pode ocorrer um aumento da estabilidade térmica. Como efeito negativo, ocorre diminuição da liberdade de movimento, o que pode resultar em diminuição da atividade enzimática (AEHLE, 2007).

A imobilização covalente é frequentemente realizada na presença de um agente ativador, como o glutaraldeído, em suportes contendo grupamentos amino primários. O glutaraldeído reage covalentemente com os grupos amino primários presentes também na enzima ligando-a irreversivelmente ao suporte (GUISÁN, 2006). Na literatura foram descritos outros agentes de ativação. Um exemplo é a genipina, obtida a partir dos frutos de *Genipa americana* e *Gardenia jasminoides* Ellis (KLEIN *et al.*, 2016).

2.4.3 Encapsulamento

O processo de encapsulamento é baseado no aprisionamento da enzima em uma matriz polimérica- as mais utilizadas são a poliacrilamida e a sílica. A principal vantagem desta técnica é que ela permite o transporte de compostos de baixo peso molecular através da matriz permeável (GUISÁN, 2006; SHELDON e VAN PELT, 2013).

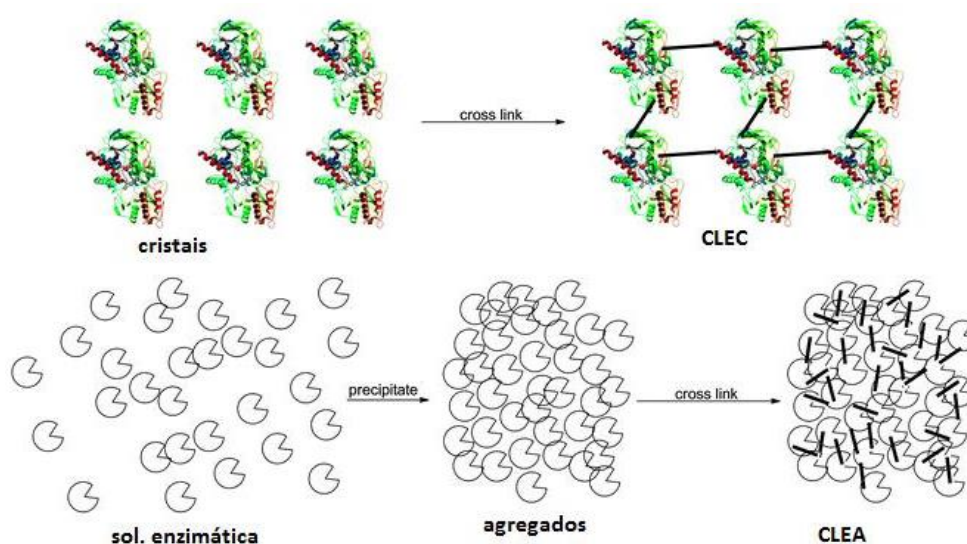
Como principais desvantagens estão os problemas difusionais, principalmente quando substratos de elevada massa molecular são usados, e a instabilidade dos suportes normalmente utilizados, limitando o uso dos agregados por longos períodos (CARVALHO *et al.*, 2006).

2.4.4 Entrecruzamento

Neste método as enzimas são ligadas entre si sem o uso de um suporte. A imobilização por este método requer apenas agentes de reticulação, tais como o glutaraldeído (PANESAR *et al.*, 2010; SHELDON, 2007).

As duas estratégias mais utilizadas (**Figura 8**) são os CLECs - *crosslinking enzyme crystals*, cristalização de enzimas puras, seguida pela reticulação ou os CLEAs - *crosslinking enzyme aggregates*, com agregação das enzimas antes da reticulação (GARCIA-GALAN *et al.*, 2011).

Figura 8 - CLECs - crosslinking enzyme crystals e CLEAs - crosslinking enzyme aggregates



Fonte: Adaptado de GARCIA-GALAN *et al.* (2011)

2.5 SUPORTES PARA IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS

O suporte é o principal contribuinte para o bom desempenho de um sistema de imobilização (MENDES *et al.*, 2011). Os materiais utilizados na confecção de suportes deveriam, idealmente, apresentar alta capacidade de retenção, ter resistência mecânica para uma longa vida operacional, não apresentar toxicidade, ter baixo custo, serem encontrados facilmente e de forma abundante na natureza e apresentar facilidade de operação em grande escala (CANILHA *et al.*, 2006; NAGASHIMA *et al.*, 1984; PRADELLA, 2001).

Os suportes segundo Mendes et al. (2011) podem ser classificados em:

1. Microporosos ou não porosos (vidro, sílica, nylon)
2. Microencapsulados (triacetato de celulose)
3. Polímeros (quitosana, poliacrilamida, Sephadex, DEAE celulose)
4. Macroporosos (sílica, alumina)

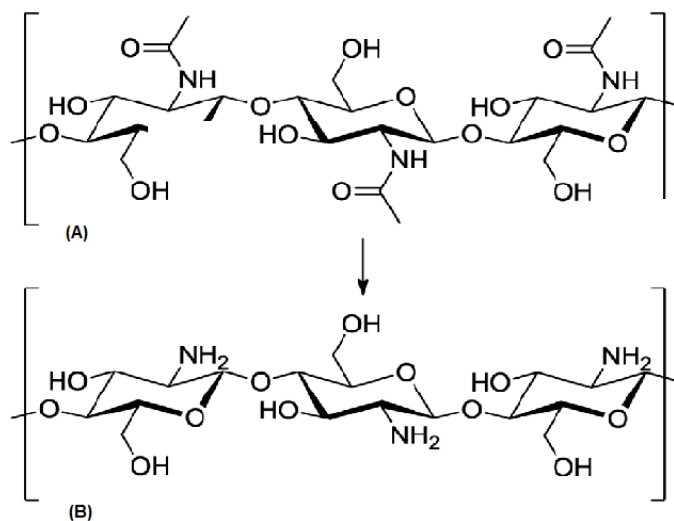
Na seleção de um suporte é necessário analisar suas propriedades físicas e químicas, bem como a possibilidade de regeneração do material, sendo as principais características a serem observadas: área superficial, permeabilidade, insolubilidade, capacidade de regeneração, morfologia e composição, natureza hidrofílica ou hidrofóbica, resistência ao ataque microbiano, resistência mecânica e custo (MENDES *et al.*, 2011; VILLENEUVE *et al.*, 2000).

Dentre os diferentes suportes empregados na imobilização de enzimas destacam-se os suportes orgânicos naturais à base de quitosana devido as suas múltiplas características, incluindo uma elevada afinidade por proteínas, a disponibilidade de grupos funcionais reativos para reações diretas com enzimas e para as modificações químicas, propriedades antibacterianas e facilidade de preparação numa variedade de formas físicas (KLEIN *et al.*, 2012; LORENZONI *et al.*, 2014; SCHOEFFER *et al.*, 2013).

2.5.1 Suportes à base de quitosana

A quitosana é a forma desacetilada da quitina (**Figura 9**). É um produto natural, de baixo custo, renovável e biodegradável, obtida do exoesqueleto de crustáceos (KRAJEWSKA, 2004).

Figura 9 - Estrutura da quitina (a) e da quitosana (b)



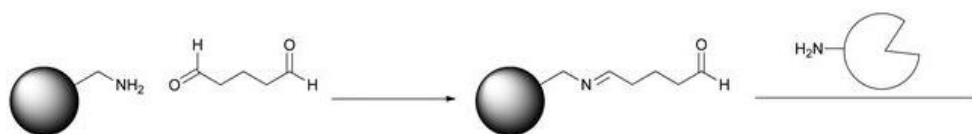
Fonte: HECKEL *et al.* (2013)

Entre as características desejáveis da quitosana pode-se destacar: alta afinidade por proteínas, disponibilidade de grupos funcionais para reação direta com enzimas ou para modificação química, hidrofiliçidade, biocompatibilidade, resistência à degradação química, propriedades antimicrobianas e facilidade de preparação em uma variedade de formas físicas (HSIEH *et al.*, 2000; JUANG *et al.*, 2001; KRAJEWSKA, 2004).

A quitosana é insolúvel em água. A sua solubilização ocorre em soluções ácidas para formar soluções viscosas que precipitam mediante um aumento do pH, formando complexos insolúveis em água, o que auxilia na produção dos géis, em suas diversas formas, sejam esferas, membranas ou fibras (KRAJEWSKA, 2004).

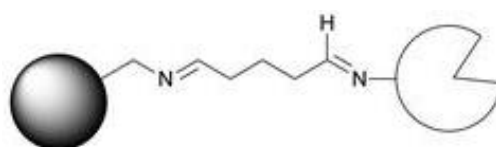
Diferentes protocolos podem ser empregados na imobilização de enzimas em quitosana, tais como adsorção, encapsulação e ligação covalente. Embora agentes de entrecruzamento como a genipina possam ser usados (KLEIN *et al.*, 2016), a imobilização covalente em quitosana ativada por glutaraldeído (**Figuras 10 e 11**) é o método mais empregado (MENDES *et al.*, 2011).

Figura 10 - Quitosana ativada com glutaraldeído



Fonte: HANEFELD (2013)

Figura 11- Complexo enzima-glutaraldeído-quitosana



Fonte: HANEFELD (2013)

REFERÊNCIAS

ABE, H.; SHIMMA, Y.; JIGAMI, Y. In vitro oligosaccharide synthesis using intact yeast cells that display glycosyltransferases at the cell surface through cell wall-anchored protein **Glycobiology**, v. 13, n. 2, p. 87-95, 2003.

ADAM, A. C.; RUBIO-TEXEIRA, M.; POLAINA, J. Lactose: The milk sugar from a biotechnological perspective. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 44, n. 7-8, p. 553-557, 2004.

AEHLE, W. **Enzymes in Industry: Production and Applications**. 3rd Edition. 2007.

AKPINAR, O.; ERDOGAN, K.; BOSTANCI, S. Production of xylooligosaccharides by controlled acid hydrolysis of lignocellulosic materials. **Carbohydrate Research**, v. 344, n. 5, p. 660-666, 2009.

AL-ASSAF, S.; PHILLIPS, G. O.; WILLIAMS, P. A. Controlling the molecular structure of food hydrocolloids. **Food Hydrocolloids**, v. 20, n. 2-3, p. 369-377, 2006.

ALBAYRAK, N.; YANG, S. T. Immobilization of *Aspergillus oryzae* beta-galactosidase on tosylated cotton cloth. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, n. 4, p. 371-383, 2002.

AVIGAD, G. Enzymatic synthesis and characterization of a new trisaccharide, alpha-lactosyl-beta-fructofuranoside **Journal of Biological Chemistry**, v. 229, n. 1, p. 121-129, 1957.

BARRETEAU, H.; DELATTRE, C.; MICHAUD, P. Production of oligosaccharides as promising new food additive generation. **Food Technology and Biotechnology**, v. 44, n. 3, p. 323-333, 2006.

BEKERS, M.; UPITE, D.; KAMINSKA, E.; LAUKEVICS, J.; GRUBE, M.; VIGANTS, A.; LINDE, R. Stability of levan produced by *Zymomonas mobilis*. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 5, p. 1535-1539, 2005.

BENJAMINS, F. **Galacto-oligosaccharide synthesis using immobilized β -galactosidase**. 2014. (Doctor of Philosophy). University of Groningen

BICKERSTAFF, G. F. Immobilisation of Enzyme and Cells. **Methods in Biotechnology Human Press**, 1996.

BIELECKA, M.; BIEDRZYCKA, E.; MAJKOWSKA, A. Selection of probiotics and prebiotics for synbiotics and confirmation of their in vivo effectiveness. **Food Research International**, v. 35, n. 2-3, p. 125-131, 2002.

BRIDIAU, N.; ISSAOUI, N.; MAUGARD, T. The effects of organic solvents on the efficiency and regioselectivity of N-acetyl-lactosamine synthesis, using the beta-galactosidase from *Bacillus circulans* in hydro-organic media. **Biotechnology Progress**, v. 26, n. 5, p. 1278-1289, 2010.

CANILHA, L.; CARVALHO, W.; SILVA, J. B. A. Biocatalisadores Imobilizados: Uso de enzimas e células imobilizadas em processos biotecnológicos. v. 36, p. 48-57, 2006.

CANTONE, S.; FERRARIO, V.; CORICI, L.; EBERT, C.; FATTOR, D.; SPIZZO, P.; GARDOSSI, L. Efficient immobilisation of industrial biocatalysts: criteria and constraints for the selection of organic polymeric carriers and immobilisation methods. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 15, p. 6262-6276, 2013.

CAO, L. Immobilised enzymes: science or art? **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 9, n. 2, p. 217-226, 2005.

CARVALHO, W.; CANILHA, L.; SILVA, S. S. Uso de biocatalisadores imobilizados: uma alternativa para a condução de bioprocessos. **Revista Analytica**, v. 23, p. 60-70, 2006.

CHIBATA, I. **Immobilized enzymes - research and development**. 1978.

CHO, S. S.; FINOCCHIARO, T. **Handbook of Prebiotics and Probiotics Ingredients: Health Benefits and Food Applications**. 2009.

CHOI, H. J.; KIM, C. S.; KIM, P.; JUNG, H. C.; OH, D. K. Lactosucrose bioconversion from lactose and sucrose by whole cells of *Paenibacillus polymyxa* harboring levansucrase activity. **Biotechnology Progress**, v. 20, n. 6, p. 1876-1879, 2004.

CRITTENDEN, R. G.; PLAYNE, M. J. Production, properties and applications of food-grade oligosaccharides. **Trends in Food Science & Technology**, v. 7, n. 11, p. 353-361, Nov 1996.

DIEZ-MUNICIO, M.; HERRERO, M.; OLANO, A.; JAVIER MORENO, F. Synthesis of novel bioactive lactose-derived oligosaccharides by microbial glycoside hydrolases. **Microbial Biotechnology**, v. 7, n. 4, p. 315-331, Jul 2014.

FARKAS, E.; SCHMIDT, U.; THIEM, J.; KOWALCZYK, J.; KUNZ, M.; VOGEL, M. Regioselective synthesis of galactosylated tri- and tetrasaccharides by use of beta-galactosidase from *Bacillus circulans*. **Synthesis-Stuttgart**, n. 5, p. 699-706, Apr 2003.

FENNEMA, O. R. D., SRINIVASAN PARKIN, KIRK L. **Química de Alimentos de Fennema**. 4ª Ed. 2010.

FERNANDEZ-ARROJO, L.; MARIN, D.; GOMEZ DE SEGURA, A.; LINDE, D.; ALCALDE, M.; GUTIERREZ-ALONSO, P.; GHAZI, I.; PLOU, F. J.; FERNANDEZ-LOBATO, M.; BALLESTEROS, A. Transformation of maltose into prebiotic isomaltooligosaccharides by a novel alpha-glucosidase from *Xantophyllomyces dendrorhous*. **Process Biochemistry**, v. 42, n. 11, p. 1530-1536, Nov 2007.

FIGUEROA-GONZALEZ, I.; QUIJANO, G.; RAMIREZ, G.; CRUZ-GUERRERO, A. Probiotics and prebiotics - perspectives and challenges. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 91, n. 8, p. 1341-1348, Jun 2011.

FUJITA, K.; KITAHATA, S.; HARA, K.; HASHIMOTO, H. PRODUCTION OF LACTOSUCROSE AND ITS PROPERTIES. **Abstracts of Papers of the American Chemical Society**, v. 202, p. 8-CARB, Aug 25 1991.

GARCIA-GALAN, C.; BERENQUER-MURCIA, A.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; RODRIGUES, R. C. Potential of Different Enzyme Immobilization Strategies to Improve Enzyme Performance. **Advanced Synthesis & Catalysis**, v. 353, n. 16, p. 2885-2904, Nov 2011.

GERMAN, J. H. "Applied enzymology of lactose hydrolysis," Milk Powders for the Future. p. 81–87, 1997.

GHAZI, I.; DE SEGURA, A. G.; FERNANDEZ-ARROJO, L.; ALCALDE, M.; YATES, M.; ROJAS-CERVANTES, M. L.; PLOU, F. J.; BALLESTEROS, A. Immobilisation of fructosyltransferase from *Aspergillus aculeatus* on epoxy-activated Sepabeads EC for the synthesis of fructo-oligosaccharides. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, v. 35, n. 1-3, p. 19-27, Aug 1 2005.

GIBSON, G. R.; PROBERT, H. M.; VAN LOO, J.; RASTALL, R. A.; ROBERFROID, M. B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. **Nutrition Research Reviews**, v. 17, n. 2, p. 259-275, Dec 2004.

GIBSON, G. R.; ROBERFROID, M. B. DIETARY MODULATION OF THE HUMAN COLONIC MICROBIOTA - INTRODUCING THE CONCEPT OF PREBIOTICS. **Journal of Nutrition**, v. 125, n. 6, p. 1401-1412, Jun 1995.

GIBSON, G. R.; SCOTT, K. P.; RASTALL, R. A.; TUOHY, K. M.; HOTCHKISS, A. **Dietary prebiotics: current status and new definition**. Food Science and Technology Bulletin: Functional Foods. 7: 1–19 p. 2010.

GIESE, E. C.; HIROSI, T.; CORRADI DA SILVA, M. D. L.; DA SILVA, R.; BARBOSA, A. D. M. Production, properties and applications of oligosaccharides. **Semina-Ciencias Agrarias**, v. 32, n. 2, p. 683-699, 2011.

GOURBEYRE, P.; DENERY, S.; BODINIER, M. Probiotics, prebiotics, and synbiotics: impact on the gut immune system and allergic reactions. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 89, n. 5, p. 685-695, May 2011.

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

GUERRERO, C.; VERA, C.; CONEJEROS, R.; ILLANES, A. Transgalactosylation and hydrolytic activities of commercial preparations of beta-galactosidase for the synthesis of prebiotic carbohydrates. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 70, p. 9-17, Mar 2015.

GUISÁN, J. M. Immobilization of Enzymes and Cells. 2006.

GULEWICZ, P.; CIESIOLKA, D.; FRIAS, J.; VIDAL-VALVERDE, C.; FREJNAGEL, S.; TROJANOWSKA, K.; GULEWICZ, K. Simple method of isolation and purification of alpha-galactosides from legumes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 8, p. 3120-3123, Aug 2000.

HAN, W.-C.; BYUN, S.-H.; KIM, M.-H.; SOHN, E. H.; LIM, J. D.; UM, B. H.; KIM, C. H.; KANG, S. A.; JANG, K.-H. Production of Lactosucrose from Sucrose and Lactose by a Levansucrase from *Zymomonas mobilis*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 19, n. 10, p. 1153-1160, Oct 2009.

HANEFELD, U. Immobilisation of hydroxynitrile lyases. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 15, p. 6308-6321, 2013.

HARA, K.; TONOZUKA, T.; ITO, T.; SAKANO, Y.; FUJITA, K. **Novel beta fructofuranosidase gene useful for producing beta fructofuranosidase and for developing variant enzymes that have increased heat resistance and transfer ratio by means of genetic engineering techniques**: Soc Techno-Innovation Agric Forestry & Fi; Zh Norin Suisan Sentan Gijutsu Sangyo; Ensuiko Sugar Refining Co Ltd 1994.

HECKEL, T.; KONIECZNA, D. D.; WILHELM, R. An Ionic Liquid Solution of Chitosan as Organocatalyst. **Catalysts**, v. 3, n. 4, p. 914-921, Dec 2013.

HSIEH, H. J.; LIU, P. C.; LIAO, W. J. Immobilization of invertase via carbohydrate moiety on chitosan to enhance its thermal stability. **Biotechnology Letters**, v. 22, n. 18, p. 1459-1464, Sep 2000.

ILLANES, A. Whey upgrading by enzyme biocatalysis. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 14, n. 6, 2011.

JOHANSSON, L.; VIRKKI, L.; ANTTILA, H.; ESSELSTROM, H.; TUOMAINEN, P.; SONTAG-STROHM, T. Hydrolysis of beta-glucan. **Food Chemistry**, v. 97, n. 1, p. 71-79, Jul 2006.

JUANG, R. S.; WU, F. C.; TSENG, R. L. Solute adsorption and enzyme immobilization on chitosan beads prepared from shrimp shell wastes. **Bioresource Technology**, v. 80, n. 3, p. 187-193, Dec 2001.

KASCHE, V.; HAUFLER, U.; RIECHMANN, L. Kinetically controlled semi synthesis of beta-lactam antibiotics and peptides. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 434, n. DEC, p. 99-105, 1984.

KLEIN, M. P.; HACKENHAAR, C. R.; LORENZONI, A. S. G.; RODRIGUES, R. C.; COSTA, T. M. H.; NINOW, J. L.; HERTZ, P. F. Chitosan crosslinked with genipin as support matrix for application in food process: Support characterization and beta-D-galactosidase immobilization. **Carbohydrate Polymers**, v. 137, p. 184-190, Feb 10 2016.

KLEIN, M. P.; NUNES, M. R.; RODRIGUES, R. C.; BENVENUTTI, E. V.; COSTA, T. M. H.; HERTZ, P. F.; NINOW, J. L. Effect of the Support Size on the Properties of beta-Galactosidase Immobilized on Chitosan: Advantages and Disadvantages of Macro and Nanoparticles. **Biomacromolecules**, v. 13, n. 8, p. 2456-2464, Aug 2012.

KRAJEWSKA, B. Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 35, n. 2-3, p. 126-139, Aug 5 2004.

LEE, J. H.; LIM, J. S.; PARK, C.; KANG, S. W.; SHIN, H. Y.; PARK, S. W.; KIM, S. W. Continuous Production of Lactosucrose by Immobilized *Sterigmatomyces elviae* Mutant. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 17, n. 9, p. 1533-1537, 2007.

LI, W.; XIANG, X. L.; TANG, S. F.; HU, B.; TIAN, L.; SUN, Y.; YE, H.; ZENG, X. X. Effective Enzymatic Synthesis of Lactosucrose and Its Analogues by beta-D-Galactosidase from *Bacillus circulans*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 9, p. 3927-3933, May 2009.

LORENZONI, A. S. G.; AYDOS, L. F.; KLEIN, M. P.; RODRIGUES, R. C.; HERTZ, P. F. Fructooligosaccharides synthesis by highly stable immobilized beta-fructofuranosidase from *Aspergillus aculeatus*. **Carbohydrate Polymers**, v. 103, p. 193-197, Mar 15 2014.

MAHONEY, R. R. Galactosyl-oligosaccharide formation during lactose hydrolysis: a review. **Food Chemistry**, v. 63, n. 2, p. 147-154, Oct 1998.

MENDES, A. A.; DE OLIVEIRA, P. C.; DE CASTRO, H. F.; GIORDANO, R. D. L. C. Application of chitosan as support for immobilization of enzymes of industrial interest. **Quimica Nova**, v. 34, n. 5, p. 831-840, 2011.

MIKUNI, K.; QIONG, W.; FUJITA, K.; HARA, K.; YOSHIDA, S.; HASHIMOTO, H. Continuous Production of 4^G-β-D-Galactosylsucrose (Lactosucrose) Using Immobilized β-Fructofuranosidase. v. 47, n. 3-4, p. 281, 2000.

MIZOTE, A.; TANIGUCHI, Y.; TAKEI, Y.; KOYA-MIYATA, S.; KOHNO, K.; IWAKI, K.; KUROSE, M.; OKU, K.; CHAEN, H.; FUKUDA, S. Lactosucrose Inhibits Body Fat Accumulation in Rats by Decreasing Intestinal Lipid Absorption. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 73, n. 3, p. 582-587, Mar 2009.

MONSAN, P.; PAUL, F. ENZYMATIC-SYNTHESIS OF OLIGOSACCHARIDES. **Fems Microbiology Reviews**, v. 16, n. 2-3, p. 187-192, Feb 1995.

MORENO, F. J.; SANZ, M. L. **Food Oligosaccharides: Production, Analysis and Bioactivity**. 2014.

MOURA, P.; BARATA, R.; CARVALHEIRO, F.; GIRIO, F.; LOUREIRO-DIAS, M. C.; ESTEVES, M. P. In vitro fermentation of xylo-oligosaccharides from corn cobs autohydrolysis by *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* strains. **Lwt-Food Science and Technology**, v. 40, n. 6, p. 963-972, 2007.

MU, W. M.; CHEN, Q. M.; WANG, X.; ZHANG, T.; JIANG, B. Current studies on physiological functions and biological production of lactosucrose. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 16, p. 7073-7080, Aug 2013b.

NAGASHIMA, M.; AZUMA, M.; NOGUCHI, S.; INUZUKA, K.; SAMEJIMA, H. Continuous ethanol fermentation using immobilized yeast-cells. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 26, n. 8, p. 992-997, 1984.

- NERI, D. F. D. M. **Immobilization of β -galactosidase onto different water insoluble matrices**. 2008. (Doutoramento). Engenharia Química e Biológica, Universidade do Minho
- OHKUSA, T.; OZAKI, Y.; SATO, C.; MIKUNI, K.; IKEDA, H. Long-term ingestion of lactosucrose increases bifidobacterium sp in human fecal flora. **Digestion**, v. 56, n. 5, p. 415-420, Sep-Oct 1995.
- OOI, L.-G.; LIONG, M.-T. Cholesterol-Lowering Effects of Probiotics and Prebiotics: A Review of in Vivo and in Vitro Findings. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 11, n. 6, p. 2499-2522, Jun 2010.
- PANESAR, P. S.; KUMARI, S.; PANESAR, R. Potential Applications of Immobilized β -Galactosidase in Food Processing Industries. **Enzyme Res. Published online**, 2010.
- PARK, A.-R.; OH, D.-K. Galacto-oligosaccharide production using microbial beta-galactosidase: current state and perspectives. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 85, n. 5, p. 1279-1286, Feb 2010.
- PARK, N. H.; CHOI, H. J.; OH, D. K. Lactosucrose production by various microorganisms harboring levansucrase activity. **Biotechnology Letters**, v. 27, n. 7, p. 495-497, Apr 2005.
- PASSOS, L. M. L.; PARK, Y. K. Fructooligosaccharides: implications in human health being and use in foods. **Ciência Rural**, v. 33, n. 2, p. 385-390, 2003.
- PERUGINO, G.; TRINCONE, A.; ROSSI, M.; MORACCI, M. Oligosaccharide synthesis by glycosynthases. **Trends in Biotechnology**, v. 22, n. 1, p. 31-37, Jan 2004.
- PILGRIM, A.; KAWASE, M.; OHASHI, M.; FUJITA, K.; MURAKAMI, K.; HASHIMOTO, K. Reaction kinetics and modeling of the enzyme-catalyzed production of lactosucrose using beta-fructofuranosidase from *Arthrobacter* sp K-1. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 65, n. 4, p. 758-765, Apr 2001.
- PRADELLA, J. G. C. **Reatores com células imobilizadas: biotecnologia industrial**. 2001.
- RABIU, B. A.; JAY, A. J.; GIBSON, G. R.; RASTALL, R. A. Synthesis and fermentation properties of novel galacto-oligosaccharides by beta-galactosidases from *Bifidobacterium* species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 6, p. 2526-2530, Jun 2001.
- RASTALL, B.; GIBSON, G. **Prebiotics: development and application**. John Wiley & Sons, 2006.

ROBERFROID, M. Prebiotics: The concept revisited. **Journal of Nutrition**, v. 137, n. 3, p. 830S-837S, Mar 2007.

RODRIGUEZ-COLINAS, B.; KOLIDA, S.; BARAN, M.; BALLESTEROS, A. O.; RASTALL, R. A.; PLOU, F. J. Analysis of fermentation selectivity of purified galacto-oligosaccharides by in vitro human faecal fermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 13, p. 5743-5752, Jul 2013.

RODRIGUEZ-COLINAS, B.; POVEDA, A.; JIMENEZ-BARBERA, J.; BALLESTEROS, A. O.; PLOU, F. J. Galacto-oligosaccharide Synthesis from Lactose Solution or Skim Milk Using the beta-Galactosidase from *Bacillus circulans*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 25, p. 6391-6398, Jun 27 2012.

ROLIM, P. M. Development of prebiotic food products and health benefits. **Food Science and Technology**, v. 35, n. 1, p. 3-10, Jan-Mar 2015.

RUDEEKULTHAMRONG, P.; SAWASDEE, K.; KAULPIBOON, J. Production of long-chain isomaltooligosaccharides from maltotriose using the thermostable amylomaltase and transglucosidase enzymes. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 18, n. 4, p. 778-786, Jul 2013.

SALMINEN, S.; VON WRIGHT, A.; OUWEHAND, A. **Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects**. 3rd. ed. New York: 2004.

SCHOEFFER, J. D. N.; KLEIN, M. P.; RODRIGUES, R. C.; HERTZ, P. F. Continuous production of beta-cyclodextrin from starch by highly stable cyclodextrin glycosyltransferase immobilized on chitosan. **Carbohydrate Polymers**, v. 98, n. 2, p. 1311-1316, Nov 6 2013.

SHELDON, R. A. Enzyme Immobilization: The Quest for Optimum Performance. **Advanced Synthesis & Catalysis**, v. 349, n. 8-9, p. 1289-1307, 2007.

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

SHODA, S.; FUJITA, M.; KOBAYASHI, S. Glycanase-catalyzed synthesis of non-natural oligosaccharides. **Trends in Glycoscience and Glycotechnology**, v. 10, n. 54, p. 279-289, Jul 1998.

SILVERIO, S. C.; MACEDO, E. A.; TEIXEIRA, J. A.; RODRIGUES, L. R. Perspectives on the biotechnological production and potential applications of lactosucrose: A review. **Journal of Functional Foods**, v. 19, p. 74-90, Dec 2015.

SLAVIN, J. Fiber and Prebiotics: Mechanisms and Health Benefits. **Nutrients**, v. 5, n. 4, p. 1417-1435, Apr 2013.

TAKAHAMA, A.; KUZE, J.; OKANO, S.; AKIYAMA, K.; NAKANE, T.; TAKAHASHI, H.; KOBAYASHI, T. Production of lactosucrose by *Bacillus natto* levansucrase and

some properties of the enzyme. **Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology**, v. 38, n. 9, p. 789-796, 1991.

TANAKA, A.; KAWAMOTO, T. **Cell and Enzyme Immobilization**. Washington DC, USA: 1999.

TOLSTOGUZOV, V. B. Functional properties of food proteins and role of protein-polysaccharide interaction. v. 4, n. 6, p. 429, 1991.

TONOZUKA, T.; TAMAKI, A.; YOKOI, G.; MIYAZAKI, T.; ICHIKAWA, M.; NISHIKAWA, A.; OHTA, Y.; HIDAKA, Y.; KATAYAMA, K.; HATADA, Y.; ITO, T.; FUJITA, K. Crystal structure of a lactosucrose-producing enzyme, *Arthrobacter* sp K-1 beta-fructofuranosidase. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 51, n. 6-7, p. 359-365, Dec 10 2012.

TZORTZIS, G.; GOULAS, A. K.; GIBSON, G. R. Synthesis of prebiotic galactooligosaccharides using whole cells of a novel strain, *Bifidobacterium bifidum* NCIMB 41171. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 68, n. 3, p. 412-416, Aug 2005.

VILLENEUVE, P.; MUDERHWA, J. M.; GRAILLE, J.; HAAS, M. J. Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, v. 9, n. 4-6, p. 113-148, Apr 21 2000.

VODENICAROVA, M.; DRIMALOVA, G.; HROMADKOVA, Z.; MALOVIKOVA, A.; EBRINGEROVA, A. Xyloglucan degradation using different radiation sources: A comparative study. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 13, n. 2, p. 157-164, Feb 2006.

VORAGEN, A. G. J. Technological aspects of functional food-related carbohydrates. **Trends in Food Science & Technology**, v. 9, n. 8-9, p. 328-335, Aug-Sep 1998.

WALLENFELS, K.; MALHOTRA, O. P. GALACTOSIDASES. **Advances in Carbohydrate Chemistry**, v. 16, p. 239-298, 1961 1961.

WATANABE, H.; NISHIMOTO, T.; KUBOTA, M.; CHAEN, H.; FUKUDA, S. Cloning, sequencing, and expression of the genes encoding an isocyclomaltooligosaccharide glucanotransferase and an alpha-amylase from a *Bacillus circulans* strain. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 70, n. 11, p. 2690-2702, Nov 2006.

3. RESULTADOS

Os resultados referentes ao trabalho de imobilização da enzima β -galactosidase e sua utilização na produção de lactosacarose estão apresentados na forma de artigo, que será submetido na revista *Journal of Functional Foods*.

**A NEW BIOPROCESS FOR THE PRODUCTION OF PREBIOTIC
LACTOSUCROSE BY AN IMMOBILIZED β -GALACTOSIDASE**

Lovaine Silva Duarte, Jéssie da Natividade Schöffler, André Soibelman Glock Lorenzoni,
Rafael C. Rodrigues, Eliseu Rodrigues and Plinho Francisco Hertz*

Biotechnology, Bioprocess and Biocatalysis Group, Institute of Food Science and Technology,
Federal University of Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9500, P.O. Box 15090, ZC
91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil

*Corresponding author:

Tel: +55 51 3308 7094; fax: +55 51 33087048

E-mail address plinho@ufrgs.br (P. F. Hertz)

ABSTRACT

A new bioprocess for the synthesis of lactosucrose was developed using an immobilized β -galactosidase on microspheres of chitosan. The effects of temperature and pH on the production of lactosucrose and other oligosaccharides were evaluated. Under the optimized reaction conditions, 30 °C and pH 7.0, the maximal yield of lactosucrose reached 79 g L⁻¹. The change of the reaction conditions, pH and temperature, allowed to modify the qualitative profile of the final products without quantitative change in the total of oligosaccharides produced. The immobilization increased the thermal and operational stability of enzyme, respectively, up to 260 times and 30 cycles of reuse with maximal lactosucrose synthesis. These results fulfill some important aspects for the enzyme immobilization and oligosaccharides synthesis: the simplicity of the protocols, the high operational stability of the enzyme and the possibility of driving the final products.

Keywords: Prebiotic; Transgalactosylation; Chitosan; β -galactosidase; Enzyme Immobilization; Lactosucrose.

1. INTRODUCTION

Lactosucrose, an oligosaccharide enzymatically synthesized from lactose and sucrose, has a potential as a prebiotic food ingredient since it showed a strong *in vitro* bifidogenic activity (Díez-Municio, Kolida, Herrero, Rastall, & Moreno, 2016). Prebiotics are beneficial to health of the host by providing the growth or activity of beneficial bacteria and, at the same time, inhibit the growth of pathogenic bacteria (Gibson & Roberfroid, 1995; Roberfroid, 2000).

The prebiotics may be obtained by synthesis (chemical or enzymatic). The synthesis catalyzed by enzymes represents an attractive alternative to classical chemical methods since allow the control of the regioselectivity and stereochemistry of the final products of the reaction (Perugino, Trincone, Rossi, & Moracci, 2004).

In a recent work, Silverio et al. (2015) reviewed the biotechnological production and potential applications of lactosucrose, highlighting the role of three different enzymes having potential to be used as catalysts for enzymatic synthesis of lactosucrose, namely: levansacarases, β -fructofuranosidases and β -galactosidases (Silverio, Macedo, Teixeira, & Rodrigues, 2015). Nowadays, these synthesis processes are carried out mainly by use of free enzymes (Mu, Chen, Wang, Zhang, & Jiang, 2013; Tonozuka et al., 2012). Because these free enzymes are expensive raw materials, they tend to substantially increase the process cost (Illanes, 2011). An alternative way to reduce the process cost is the use of immobilized enzymes, because they can be reused several times and in continuous process (making it cheaper), and may increase the enzyme stability (Garcia-Galan, Berenguer-Murcia, Fernandez-Lafuente, & Rodrigues, 2011). Immobilization may also be the key to optimizing the operational performance of an enzyme in industrial processes (Roger A Sheldon, 2007). Meanwhile, so far, there is no studies about the use of immobilized β -galactosidase for the

lactosucrose production. Therefore, as far as we are concerned, this is the first work reporting the immobilization of β -galactosidase for such purpose.

In our recent works, successful immobilization of enzymes on chitosan beads resulted in biocatalysts with high thermal and operational stability (Klein et al., 2013; Klein et al., 2012; Lorenzoni, Aydos, Klein, Rodrigues, & Hertz, 2014; Schoeffer, Klein, Rodrigues, & Hertz, 2013; Valerio, Alves, Klein, Rodrigues, & Hertz, 2013). Particularly, in some cases, thermal stability allowed the synthesis of oligosaccharides at high temperatures, which improves the solubility of carbohydrate, decreasing the viscosity and preventing crystallization (Lorenzoni et al., 2014; Schoeffer et al., 2013). Thereby making possible the use of high concentrations of sugars, providing higher enzymatic conversions. Furthermore, the thermal stability of the free enzymes may limit the long-term application of biocatalysts in the industrial process (Liese & Hilterhaus, 2013).

In this context, the aim of this work is to develop a new bioprocess for lactosucrose synthesis using β -galactosidase immobilized on chitosan. In this sense, we evaluated the effects of immobilization approach on the retention of activity, thermal stability and operational stability. Moreover, a quantitative and qualitative analysis of the oligosaccharides mixture produced, as a function of the transgalactosylation reaction conditions, was performed.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Materials

β -D-galactosidase from *B. circulans* was obtained from BIOLACTASA NTL CONC (Biocon, Spain). Chitosan (from shrimp shells, $\geq 75\%$ deacetylated), *o*-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside (ONPG), lactose ($\geq 98\%$), sucrose ($\geq 99.5\%$), glucose (99%), galactose

(98 %) were purchased from Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Glutaraldehyde was purchased from Nuclear. Acetonitrile (HPLC grade) was purchased from J.T. Baker. Lactosucrose (≥ 97 %) was acquired from LC Scientific (Canada). All other chemicals were of analytical grade.

2.2. Enzymatic activity

The activity of the free β -galactosidase was determined using ONPG as substrate. The reaction was carried out in 500 μ L of sodium phosphate buffer (0.1 M, pH 6.0) containing 28 mM ONPG and 25 μ L of enzyme for 2 min at 37 °C. The reaction was stopped by adding 1.5 mL of sodium bicarbonate solution (1 M, pH 10). The liberated *o*-nitrophenol was determined spectrophotometrically at 415 nm. The commercial preparation showed 3140 U mL⁻¹ of enzyme activity.

In order to determine the activity of the immobilized β -galactosidase the following procedure was used: two chitosan spheres (1 mg of dry support) were incubated with 1 mL of sodium phosphate buffer (0.1 M, pH 6) containing ONPG (28 mM) during 2 min at 37 °C. The reaction was stopped by adding 3.0 mL of sodium bicarbonate solution (1 M, pH 10). The liberated *o*-nitrophenol was determined in a spectrophotometer at 415 nm.

One unit of enzyme activity was defined as the amount of enzyme hydrolyzing 1 μ mol of ONPG per minute.

2.3. Chitosan support preparation

Chitosan beads were prepared as described by (Klein et al., 2012). Briefly, acetic acid solution (0.35 M) was used to dissolve chitosan (2 % w/v), sonicated 20 min in order to remove the air bubbles and added dropwise into the coagulation solution (sodium hydroxide 1 M and ethanol 26 % v/v) under slow agitation. Then, the macroparticles were washed with

distilled water until neutrality and the activation was performed, by incubating with glutaraldehyde (5 % v/v) prepared in potassium phosphate buffer (0.1 M, pH 7.0) for 3 h. At the end, activated chitosan particles were washed with the same buffer to remove the excess of glutaraldehyde.

2.4. Enzyme immobilization

The enzyme immobilization was carried out incubating 0.05 g of support with 10 mL of enzyme solution, with different protein concentrations, in sodium phosphate buffer (0.1 M, pH 6.0), in order to obtain 25, 50, 100, 200 and 400 mg of protein per g of dry support. The mixture was incubated in orbital shaker (200 rpm), overnight (~16 h) at room temperature (20 °C). At the end, the unbound proteins were removed by sequentially washing of the beads with phosphate buffer (0.1 M, pH 6.0), NaCl (1 M) and ethylene glycol (0.2 M). The protein concentration (mg mL^{-1}) of immobilization solutions was determined by the Lowry method (Lowry, Rosebrough, Farr, & Randall, 1951).

Immobilization yield and efficiency were calculated according to Eqs. 1 and 2, respectively (Roger A. Sheldon & van Pelt, 2013):

$$\text{Immobilization yield (\%)} = 100 \times \left(\frac{\text{immobilized activity}}{\text{starting activity}} \right) \quad (1)$$

$$\text{Immobilization efficiency (\%)} = 100 \times \left(\frac{\text{observed activity}}{\text{immobilized activity}} \right) \quad (2)$$

2.5. Thermal stability

Free and immobilized enzymes were incubated at 50, 60 and 70 °C by up to 96 h. Thermal stability was performed in phosphate buffer (0.1 M, pH 6.0). The effect of the presence of substrate (lactose 30 % w/v and sucrose 30 % w/v), was also tested at 70 °C in

the same buffer (at this temperature the lowest thermal stability was previously detected). Samples were withdrawn at regular time intervals and placed in ice bath to stop thermal inactivation. Enzyme activity was then measured by ONPG hydrolysis (method described in the Enzymatic activity section).

The thermal inactivation of enzymes can be predicted by a first order reaction (Eq. 3),

$$\frac{A}{A_0} = \exp(-kt) \quad (3)$$

where A is the enzyme activity at t time, A_0 is the initial enzyme activity, t is the treatment time, and k is the inactivation rate constant at the studied temperature. The value of k was determined by fitting the first order model to the data of the residual enzyme activity plot (A/A_0) versus time (min) using nonlinear regression.

The enzyme half-life ($t_{1/2}$) is the time required for the enzyme to decay 50% of its initial value of activity, and it was calculated according to the Eq. 4:

$$t_{1/2} = \frac{\ln(2)}{k} \quad (4)$$

2.6. Effects of the pH and temperature on the synthesis of lactosucrose

The effects of the pH and temperature on the production of lactosucrose were evaluated in a mixture of 30% (w/v) sucrose and 30% (w/v) lactose with 3 spheres per mL of immobilized enzyme or 5 μ L of free enzyme for 24 h. The pH and temperature for each assay varied according the experimental design presented in **Table 1**. The experimental design consisted of a 2^2 full factorial central composite design.

After 24 h, the reaction with free enzyme was stopped by heating at 95 °C for 5 minutes, and the spheres with immobilized enzyme were removed from the reaction medium.

The samples were analyzed by HPLC-RID.

Table 1 – Experimental design analysis for determination of the pH and temperature conditions for the lactosucrose production.

| Run | Temperature (°C) | pH | Lactosucrose (g.L ⁻¹) | |
|-----|------------------|------------|-----------------------------------|--------------------|
| | | | Free enzyme | Immobilized enzyme |
| 1 | 36 (-1) | 4.9 (-1) | 74.31 | 76.45 |
| 2 | 36 (-1) | 9.1 (+1) | 73.80 | 80.52 |
| 3 | 64 (+1) | 4.9 (-1) | 59.56 | 41.83 |
| 4 | 64 (+1) | 9.1 (+1) | 62.02 | 52.81 |
| 5 | 30 (-1.41) | 7 (0) | 78.90 | 79.61 |
| 6 | 70 (+1.41) | 7 (0) | 58.87 | 44.64 |
| 7 | 50 (0) | 4 (-1.41) | 50.11 | 47.78 |
| 8 | 50 (0) | 10 (+1.41) | 50.22 | 50.21 |
| 9 | 50 (0) | 7 (0) | 60.76 | 59.42 |
| 10 | 50 (0) | 7 (0) | 59.63 | 55.88 |
| 11 | 50 (0) | 7 (0) | 60.58 | 60.67 |

2.7. Enzymatic synthesis of oligosaccharides

From the best conditions of pH and temperature obtained in the experimental design (pH 7 and 30 °C), it was performed an enzymatic kinetic to verify the synthesis of lactosucrose and others oligosaccharides by immobilized β -galactosidase. It was used sucrose (30%, w / v) and lactose (30% w / v) in sodium phosphate buffer (0.1M, pH 7.0) at 30 °C with 3 spheres per ml for 8 h. At appropriate intervals, samples were withdrawn and analyzed by HPLC RID.

2.8. Operational stability of immobilized β -galactosidase for lactosucrose synthesis

The operational stability of the immobilized enzyme was evaluated during 30 transgalactosylation cycles. The immobilized enzyme (25 spheres per mL) was incubated in a lactose (30%, w/v) and sucrose (30%, w/v) in 0.1 M sodium phosphate buffer at pH 7.0 and 30 °C for 105 min. At the end of each cycle, sample was collected, diluted, filtered and analyzed by HPLC-RID, and the particles of immobilized enzyme were removed from the reaction medium, washed 3-times with 0.1 M sodium phosphate buffer and added to a fresh substrate solution.

2.9. Identification of oligosaccharides by HPLC-MSⁿ

The identification of tri and tetrasaccharides was performed in a Shimadzu HPLC (Kyoto, Japan) connected to a mass spectrometer (MS) with a quadrupole-time of flight (q-TOF) analyzer and an electrospray ionization (ESI) source (Bruker Daltonics, model micrOTOF-QIII, Bremen, Germany).

The carbohydrates (glucose, lactose, sucrose, lactosucrose and GOS) were separated on a Kromasil column amine (250 x 4.6 mm, 5 μ m) in isocratic mode using as mobile phase a solution of acetonitrile:water (75:25, v/v), with a flow rate of 1 mL.min⁻¹ and oven

temperature of 40 °C. The column eluate was split to allow only around 0.50 mL.min⁻¹ entering the ESI interface. The mass spectra was acquired with a scan range from m/z 100 to m/z 1000. The MS parameters were set as follows: ESI source in positive ion mode; capillary voltage: +4000 V (positive), end plate offset: -500 V, dry gas (N₂) temperature: 350 °C, flow rate: 8 L.min⁻¹, nebulizer: 30 psi. MS² and MS³ were set in manual mode applying fragmentation energy of 34 eV.

The lactosucrose (**Supplementary Material Figure S1**) was identified and other oligosaccharides tentatively identified based on the following information: elution order and retention time in the normal phase column, spike of standard, MS and MS² spectra features as compared to standard analyzed under the same conditions and data available in the literature.

2.10. Quantification of carbohydrates by HPLC-RID

The concentration of the carbohydrates (glucose, lactose, sucrose, lactosucrose and GOS) was determined using a HPLC (Shimadzu, Japan) connected to a refraction index detector (RID). The separation of the carbohydrates was carried using the same conditions previously described in the identification of oligosaccharides by HPLC-MSⁿ section.

The carbohydrates were quantified using six-point analytical curves of lactose, glucose, sucrose, galactose and lactosucrose. The validation of the method was performed and the results are shown in the **Supplementary Material Table S1**.

The galactose was not effectively separated from other sugars in the chromatographic conditions above presented. Thus, the galactose was separated on an Aminex HPX-87C column (300 mm × 7.8 mm × 9 μm) in isocratic mode using ultra-pure water as the mobile phase, with a flow rate of 0.6 mL.min⁻¹ and oven temperature of 85 °C.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Effect of protein loading on the enzyme immobilization

The immobilization yield and efficiency for different protein loadings are presented in **Table 2**. Increasing the protein concentration from 25 up to 200 mg g⁻¹ support the immobilization yield was almost 100%. However, additional raising up to 400 mg g⁻¹ shows a decrease (around 20%) in the immobilization yield and a slightly increased in immobilized enzymatic activity. At all protein loadings tested, it was found a low efficiency of immobilization (Table 2). The low efficiency of immobilization may occur due to the high immobilized enzyme concentrations causing diffusion limitation of substrate to the active site of the enzyme (Wong, Khan, & Micklefield, 2009) or by alteration in the tertiary structure of the enzyme, when the immobilization occurs with groups related to its active site (Tanriseven & Aslan, 2005).

Considering that the efficiency of immobilization decreases as the protein concentration increases beyond 200 mg g⁻¹, in the following experiments, the immobilization was carried out with a protein load of 200 mg g⁻¹ support, which provided a better relationship between activity of the immobilized enzyme and the amount of protein used.

Table 2 – Effect of the protein loading in the β -galactosidase immobilization.

| Protein concentration applied (mg.g ⁻¹ dry support) | Enzyme concentration applied (U.g ⁻¹ dry support) | Immobilized activity (U.g ⁻¹) | Immobilization yield (%) | Immobilization efficiency (%) |
|--|--|---|--------------------------|-------------------------------|
| 25 | 1400 | 197.95 | 100.00 | 11.03 |
| 50 | 2800 | 209.58 | 99.96 | 6.66 |
| 100 | 5600 | 250.36 | 100.00 | 5.54 |
| 200 | 11200 | 335.53 | 95.15 | 3.30 |
| 400 | 22400 | 325.93 | 80.96 | 2.17 |

3.2. Thermal stability

The thermal stability of free and immobilized β -galactosidase and the stabilization factor for each temperature are shown in **Figure 1** and **Table 3**, respectively.

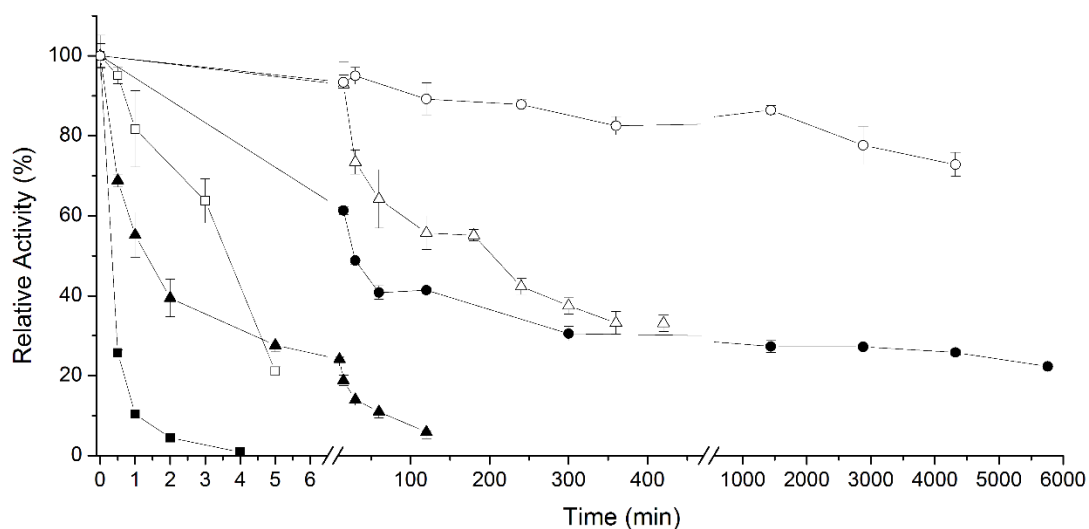


Figure 1 - Thermal stability of free enzyme and immobilized β -galactosidase at 50 °C (●, ○), 60 °C (▲, △) and 70 °C (□, ■). Open symbols: immobilized enzyme; Closed symbols: free enzyme

In general, the thermal stability of the immobilized β -galactosidase was higher than the free enzyme. The stabilizing effect was inversely related with increasing temperature. The stabilizing effect conferred by immobilization on chitosan particles has already been mentioned by other authors (Klein et al., 2012; Lorenzoni et al., 2014). This shows that the process of immobilization, using particles of chitosan as carrier, has a positive effect on the thermal stability of β -galactosidase, possibly by protecting its active conformation of heat damage (Zhang, Gao, & Gao, 2010). Besides the linkage of the enzyme in the support, it is possible that some of the reactive groups of the chitosan, free from reaction with glutaraldehyde, can react with surface charges of the enzyme, increasing their stability. This protective effect could be multiplied when substrates are added to the reaction medium. In fact, the thermal stability of enzymes may be improved by sugars and other osmolytes by reducing the enzyme movement, due to the preferential exclusion of the osmolytes from the protein backbone, thus avoiding unfolding and denaturation (Kumar, Attri, & Venkatesu, 2012; Liu, Ji, Zhang, Dong, & Sun, 2010). In the presence of substrates (**Figure 2**), lactose and sucrose, the immobilized enzyme remains more than 90 % active after 90 min at 70 °C. **Table 3** shows that it was possible to get a high stabilization factor (4279) for the immobilized enzyme in the presence of substrate compared to the free enzyme in the absence of substrate.

Table 3 - Stabilization factor for immobilized β -galactosidase at each temperature

| Temperature (°C) | $t_{1/2}$ Free enzyme | $t_{1/2}$ Immobilized enzyme | Stabilization factor |
|---------------------|--------------------------|---------------------------------|-------------------------|
| 70 | 0.27 | 2.72 | 9.98 ⁽¹⁾ |
| 60 | 1.36 | 197.28 | 145.00 ⁽¹⁾ |
| 50 | 38.99 | 10179.62 | 261.01 ⁽¹⁾ |
| 70 ⁽⁴⁾ | - | 1166.79 | 4279.41 ⁽²⁾ |
| 70 ⁽⁴⁾ | - | 1166.79 | 428.85 ⁽³⁾ |

- (1) Immobilized enzyme compared with free enzyme in the absence of substrate.
(2) Immobilized enzyme in the presence of substrate compared with free enzyme in the absence of substrate.
(3) Immobilized enzyme in the presence of substrate compared with immobilized enzyme in the absence of substrate.
(4) Immobilized enzyme in the presence of substrate.

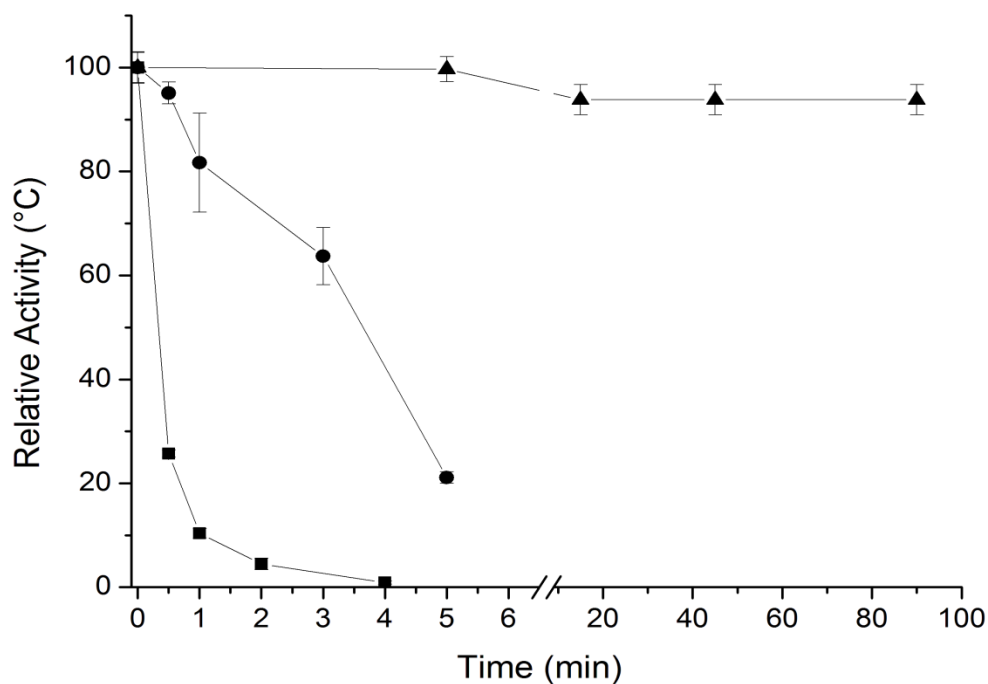


Figure 2 - Thermal stability of β -galactosidase at 70 °C. Free enzyme (■), immobilized enzyme (●), immobilized enzyme in the presence of substrate (▲).

3.3. Effect of pH and temperature on the lactosucrose synthesis

The effect of pH and temperature on the lactosucrose synthesis was studied using a central composite design, and the results are presented in **Table 1**. The lactosucrose concentrations ranged from 50 to 80 g L⁻¹ for both, free and immobilized enzymes. Statistical testing of the model was done using Fisher's statistical test for analysis of variance (ANOVA). For free enzyme, the determination coefficient ($R^2 = 0.85$) implies that the sample variation of 85 % for lactosucrose synthesis is attributed to the independent variables, and can be explained by the model. For immobilized enzyme, the determination coefficient was 0.91. In both cases, there was a satisfactory representation of the process model and a good correlation between the experimental results and the theoretical values predicted by the model equations. Additionally, for the two tested enzymes, the linear effects of temperature were negative and statistically significant ($p < 0.01$). For free enzyme the temperature linear effect was -13.6 and for immobilized enzyme was -27.8, meaning that the increase in the temperature from the level -1 to 1 represents a decrease in the enzyme activity and lactosucrose concentration. The pH effect was not statistically significant for free and immobilized enzymes.

The effect of pH and temperature on the lactosucrose synthesis can be better understood by observing the contour plots showed in **Figure 3**. High lactosucrose concentrations from free and immobilized β -galactosidase are obtained at low temperatures and in a wide pH range (Figures 3A and 3B). However, the temperature range for the immobilized enzyme is somewhat wider. Higher yields of lactosucrose at low temperatures have been reported by (Li et al., 2009). These authors also observed that an increase of temperature from 40 °C to 50 °C resulted in decrease of yield of lactosucrose. They suggest that, at high temperatures, lactosucrose is liable to transgalactosylation by the same enzyme, forming other trisaccharides and tetrasaccharides.

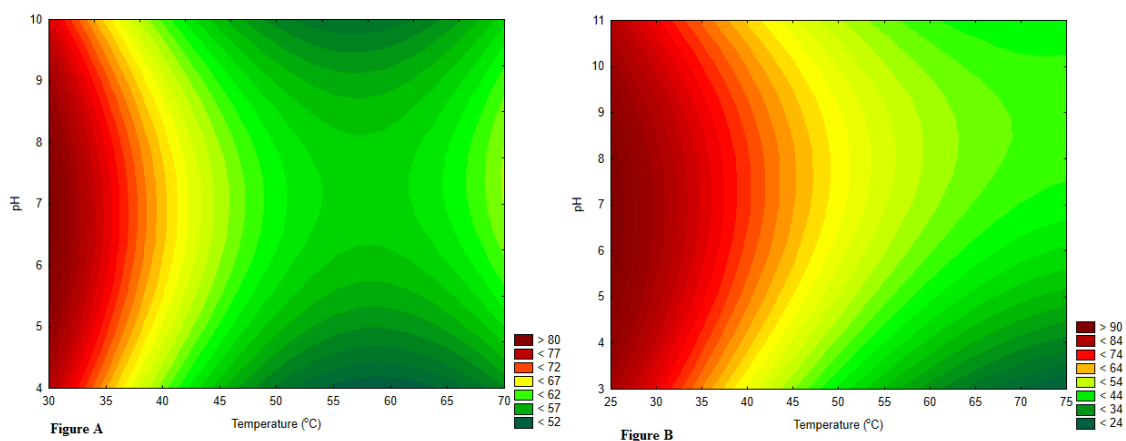


Figure 3 - Synthesis of lactosucrose from free β -galactosidase (A) and lactosucrose from immobilized β -galactosidase (B)

Although the yield of lactosucrose was similar in Run 2 (36 °C, pH 9.1) and Run 5 (30 °C, pH 7), the reaction conditions of experiment 2 were not chosen because of lower enzyme stability for long-term use. Besides, even β -galactosidase from *B. circulans* seems to be stable at higher pH, when long-term reactions are taken, the enzyme could be partially or totally inactivated. Indeed, a pH of 9.2 there is a loss of 20 % of enzyme activity while at pH 9.4, the loss is 40 % and at a pH 9.6, a complete inactivation occurs after 22 h of reaction (Benjamins, Boxem, KleinJan-Noeverman, & Broekhuis, 2014).

Additionally, the content of galactooligosaccharides (GOS) and total oligosaccharides were measured at different temperatures and pHs for the immobilized enzyme. As can be seen in **Figure 4**, the total oligosaccharides production of has a wide range of pH and temperature, remaining constant at all reaction conditions. On the other hand, the production of lactosucrose has an inverse relationship with temperature increase. The highest production is at pH 7.0 at 30 °C, while the GOS production gradually increases with increasing temperature to 64 °C and has a peak production at this temperature at a lower pH

(4.9). However, 64 °C appears to be the temperature limit, since at the highest tested temperature (70 °C) were obtained lower yields for all oligosaccharides when using immobilized enzymes. These results clearly demonstrate that it is possible to obtain a mixture of oligosaccharides with prebiotic potential using sucrose and lactose as a substrate and that the concentration of the main products of this mixture may be partially controlled by the conditions of pH and temperature.

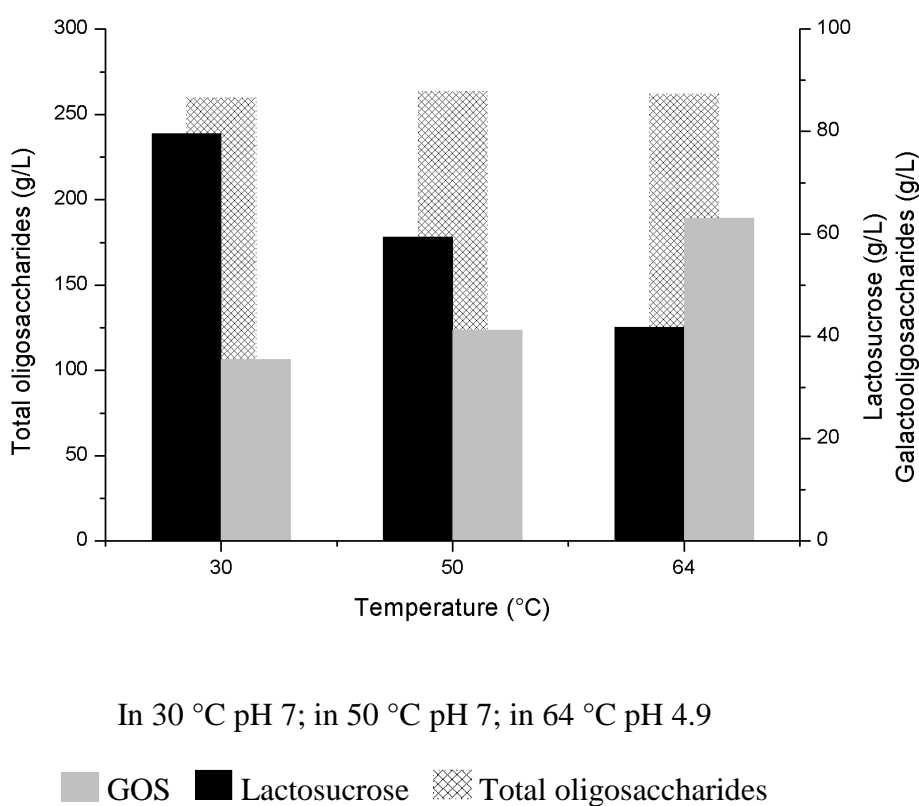


Figure 4 – Effect of pH and temperature on the concentrations of lactosucrose, galactooligosaccharides and total oligosaccharides.

3.4. Kinetics of lactosucrose and oligosaccharides synthesis

The kinetics of synthesis of the lactosucrose and oligosaccharides are show in **Figure 5**. At the initial stage, there was only sucrose and lactose. The production of lactosucrose and GOS was observed after 1 h. As time passes, it can be observed the formation of two

trisaccharides and after 5 h of reaction was formed a tetrasaccharide. The greater consumption of lactose relative to sucrose suggests the simultaneous formation of GOS. The concentration of galactose remained low along the reaction (data not shown). Moreover, the HPLC-MS analysis showed that oligosaccharides with a higher degree of polymerization are formed (**Supplementary Material Figure S2**).

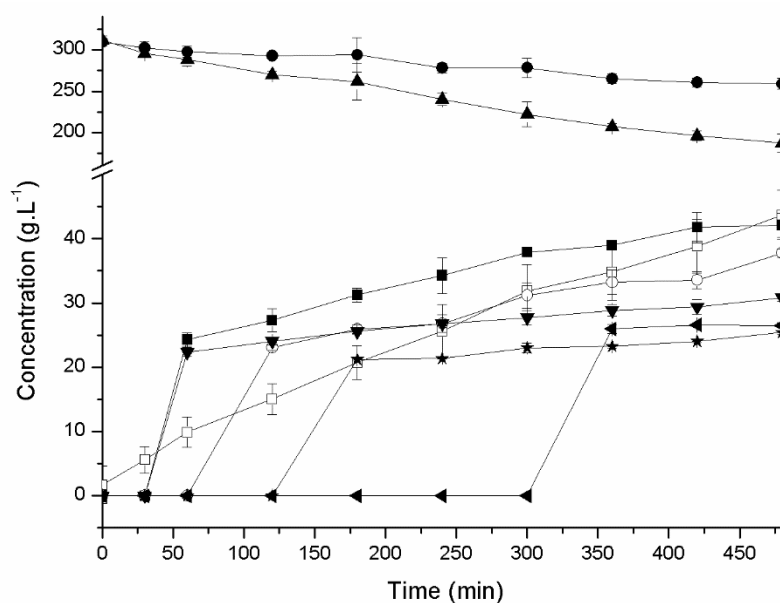


Figure 5 - Reaction kinetics catalyzed by immobilized β -galactosidase: Glucose (\square), Sucrose (\bullet), Lactose (\blacktriangle), Lactosucrose (\blacksquare), Trisaccharide 1 (\circ), Trisaccharide 2 ($*$), GOS (\blacktriangledown), Tetrasaccharide (\blacktriangleleft).

Lactosucrose is the main product formed. In transgalactosylation reactions with β -galactosidase from *Bacillus circulans*, in the presence of lactose and sucrose, lactose can act as both donor and galactosyl acceptor, since sucrose is always acceptor. This behavior was also reported by (Li et al., 2009) in synthesizing lactosucrose by free β -galactosidase.

The concentrations, after 8 h reaction with three spheres per mL, were 42.08 g L⁻¹ of lactosucrose, 30.79 g.L⁻¹ of GOS and 162.58 g.L⁻¹ of total oligosaccharides.

3.5. Operational stability

The **Figure 6** shows the operational stability of the immobilized enzyme. It can be observed that after 30 reuses (105 min each) the concentration of lactosucrose, GOS and total oligosaccharides remained unchanged. This operational stability enables that the enzyme can be used for many reaction cycles without loss of activity, overcoming the drawback of low immobilization efficiency. These results are comparable with the results obtained by (Klein et al., 2012), that studied β -galactosidase immobilized on chitosan macro and nanoparticles. The authors reported good operational stability at 37 °C, thus confirming once again the capability of chitosan as an immobilizing agent and stabilization of enzymes. Ideally, the immobilization of enzymes should provide a high operational stability, which translates into multiple reuses in order to offset the high cost of the enzymes and the immobilization process (Bayramoglu, Tunali, & Arica, 2007).

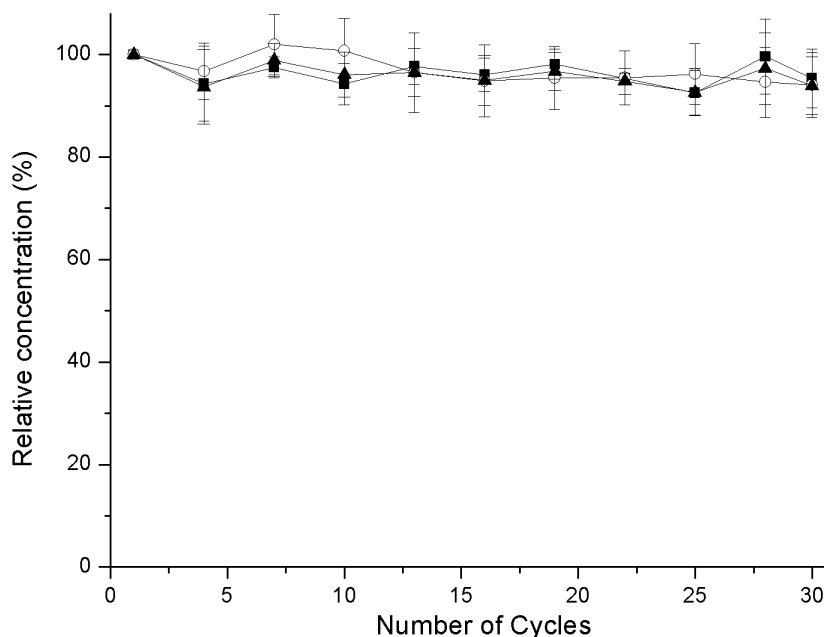


Figure 6 - Shows the operational stability of immobilized the β -galactosidase. Lactosucrose (■), GOS (○) and Total Oligosaccharides (▲)

4. CONCLUSIONS

The development of a novel bioprocess of lactosucrose synthesis using β -galactosidase from *B. circulans* immobilized on chitosan was successfully developed. The operational stability of the new biocatalyst is high and one of the main objectives in the immobilized enzyme technology that is to increase the enzyme stability was achieved. In addition, to the observed improvements, at the operating range of pH and temperature of the enzyme, for the first time, it was shown these parameters may be advantageously employed to drive the main final product of transgalactosylation reaction. It was clearly demonstrated that lactosucrose was produced at low temperatures while GOS concentrations were higher at high temperatures, using the same immobilized enzyme. Therefore, immobilized β -galactosidase may be considered a potential candidate for future industrial production of lactosucrose.

Acknowledgments

The authors thank to Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) of the Brazilian government for the financial support of this work.

REFERENCES

Bayramoglu, G., Tunali, Y., & Arica, M. Y. (2007). Immobilization of beta-galactosidase onto magnetic poly(GMA-MMA) beads for hydrolysis of lactose in bed reactor. *Catalysis Communications*, 8, 1094-1101.

Benjamins, E., Boxem, L., KleinJan-Noeverman, J., & Broekhuis, T. A. (2014). Assessment of repetitive batch-wise synthesis of galacto-oligosaccharides from lactose slurry using immobilised beta-galactosidase from *Bacillus circulans*. *International Dairy Journal*, 38, 160-168.

Díez-Municio, M., Kolida, S., Herrero, M., Rastall, R. A., & Moreno, F. J. (2016). In vitro faecal fermentation of novel oligosaccharides enzymatically synthesized using microbial transglycosidases acting on sucrose. *Journal of Functional Foods*, 20, 532-544.

Garcia-Galan, C., Berenguer-Murcia, A., Fernandez-Lafuente, R., & Rodrigues, R. C. (2011). Potential of Different Enzyme Immobilization Strategies to Improve Enzyme Performance. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 353, 2885-2904.

Gibson, G. R., & Roberfroid, M. B. (1995). Dietary modulation of human colonic microbiota-introducing the concept of prebiotics. *Journal of Nutrition*, 125, 1401-1412.

Illanes, A. (2011). Whey upgrading by enzyme biocatalysis. [Review]. *Electronic Journal of Biotechnology*, 14, 1-28.

Klein, M. P., Fallavena, L. P., Schoeffler, J. d. N., Ayub, M. A. Z., Rodrigues, R. C., Ninow, J. L., & Hertz, P. F. (2013). High stability of immobilized beta-D-galactosidase for lactose hydrolysis and galactooligosaccharides synthesis. *Carbohydrate Polymers*, 95, 465-470.

Klein, M. P., Nunes, M. R., Rodrigues, R. C., Benvenuti, E. V., Costa, T. M. H., Hertz, P. F., & Ninow, J. L. (2012). Effect of the Support Size on the Properties of beta-Galactosidase Immobilized on Chitosan: Advantages and Disadvantages of Macro and Nanoparticles. *Biomacromolecules*, 13, 2456-2464.

Kumar, A., Attri, P., & Venkatesu, P. (2012). Effect of polyols on the native structure of alpha-chymotrypsin: A comparable study. *Thermochimica Acta*, 536, 55-62.

Li, W., Xiang, X. L., Tang, S. F., Hu, B., Tian, L., Sun, Y., . . . Zeng, X. X. (2009). Effective Enzymatic Synthesis of Lactosucrose and Its Analogues by beta-D-Galactosidase from *Bacillus circulans*. [Article]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 3927-3933.

Liese, A., & Hilterhaus, L. (2013). Evaluation of immobilized enzymes for industrial applications. *Chemical Society Reviews*, 42, 6236-6249.

Liu, F.-F., Ji, L., Zhang, L., Dong, X.-Y., & Sun, Y. (2010). Molecular basis for polyol-induced protein stability revealed by molecular dynamics simulations. *Journal of Chemical Physics*, 132.

Lorenzoni, A. S. G., Aydos, L. F., Klein, M. P., Rodrigues, R. C., & Hertz, P. F. (2014). Fructooligosaccharides synthesis by highly stable immobilized beta-fructofuranosidase from *Aspergillus aculeatus*. *Carbohydrate Polymers*, 103, 193-197.

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, *193*, 265-275.

Mu, W., Chen, Q., Wang, X., Zhang, T., & Jiang, B. (2013). Current studies on physiological functions and biological production of lactosucrose. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *97*, 7073-7080.

Perugino, G., Trincone, A., Rossi, M., & Moracci, M. (2004). Oligosaccharide synthesis by glycosynthases. *Trends in Biotechnology*, *22*, 31-37.

Roberfroid, M. B. (2000). Prebiotics and probiotics: are they functional foods? *American Journal of Clinical Nutrition*, *71*, 1682S-1687S.

Schoeffer, J. d. N., Klein, M. P., Rodrigues, R. C., & Hertz, P. F. (2013). Continuous production of beta-cyclodextrin from starch by highly stable cyclodextrin glycosyltransferase immobilized on chitosan. *Carbohydrate Polymers*, *98*, 1311-1316.

Sheldon, R. A. (2007). Enzyme Immobilization: The Quest for Optimum Performance. *Advanced Synthesis & Catalysis*, *349*, 1289-1307.

Sheldon, R. A., & van Pelt, S. (2013). Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. *Chemical Society Reviews*, *42*, 6223-6235.

Silverio, S. C., Macedo, E. A., Teixeira, J. A., & Rodrigues, L. R. (2015). Perspectives on the biotechnological production and potential applications of lactosucrose: A review. *Journal of Functional Foods*, *19*, 74-90.

Tanriseven, A., & Aslan, Y. (2005). Immobilization of Pectinex Ultra SP-L to produce fructooligosaccharides. *Enzyme and Microbial Technology*, *36*, 550-554.

Tonozuka, T., Tamaki, A., Yokoi, G., Miyazaki, T., Ichikawa, M., Nishikawa, A., . . . Fujita, K. (2012). Crystal structure of a lactosucrose-producing enzyme, *Arthrobacter* sp K-1 beta-fructofuranosidase. *Enzyme and Microbial Technology*, *51*, 359-365.

Valerio, S. G., Alves, J. S., Klein, M. P., Rodrigues, R. C., & Hertz, P. F. (2013). High operational stability of invertase from *Saccharomyces cerevisiae* immobilized on chitosan nanoparticles. *Carbohydrate Polymers*, *92*, 462-468.

Wong, L. S., Khan, F., & Micklefield, J. (2009). Selective Covalent Protein Immobilization: Strategies and Applications. *Chemical Reviews*, *109*, 4025-4053.

Zhang, S., Gao, S., & Gao, G. (2010). Immobilization of beta-Galactosidase onto Magnetic Beads. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *160*, 1386-1393.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Table S1. Validation parameters of the HPLC-RID method

| Compound | Linearity range (mg mL ⁻¹) | R ² ^a | LOD ^b (mg mL ⁻¹) | LOQ ^c (mg mL ⁻¹) | Repeatability (%) | | |
|--------------|---|-----------------------------|--|--|-------------------|------------------|----------------|
| | | | | | 1 ^d | 2.5 ^d | 4 ^d |
| Fructose | 0.25-5.0 | 0.999 | 0.08 | 0.23 | 3.93 | 6.75 | 6.96 |
| Glucose | 0.25-5.0 | 0.999 | 0.17 | 0.50 | 3.74 | 11.2 | 3.08 |
| Sucrose | 0.25-5.0 | 0.999 | 0.14 | 0.52 | 2.13 | 5.85 | 7.08 |
| Lactose | 0.25-5.0 | 0.998 | 0.26 | 0.79 | 6.57 | 9.17 | 3.90 |
| Rafinose | 0.25-5.0 | 0.999 | 0.12 | 0.35 | 4.71 | 1.50 | 1.87 |
| Staquiose | 0.25-5.0 | 0.999 | 0.12 | 0.38 | 4.19 | 4.55 | 4.41 |
| Lactosucrose | 0.25-5.0 | 0.990 | 0.63 | 1.92 | n.d. | n.d. | n.d. |

^a R² = determination coefficient. ^b LOD = limit of detection. ^c LOQ = limit of quantification. ^d mg mL⁻¹. n.d. = not determined.

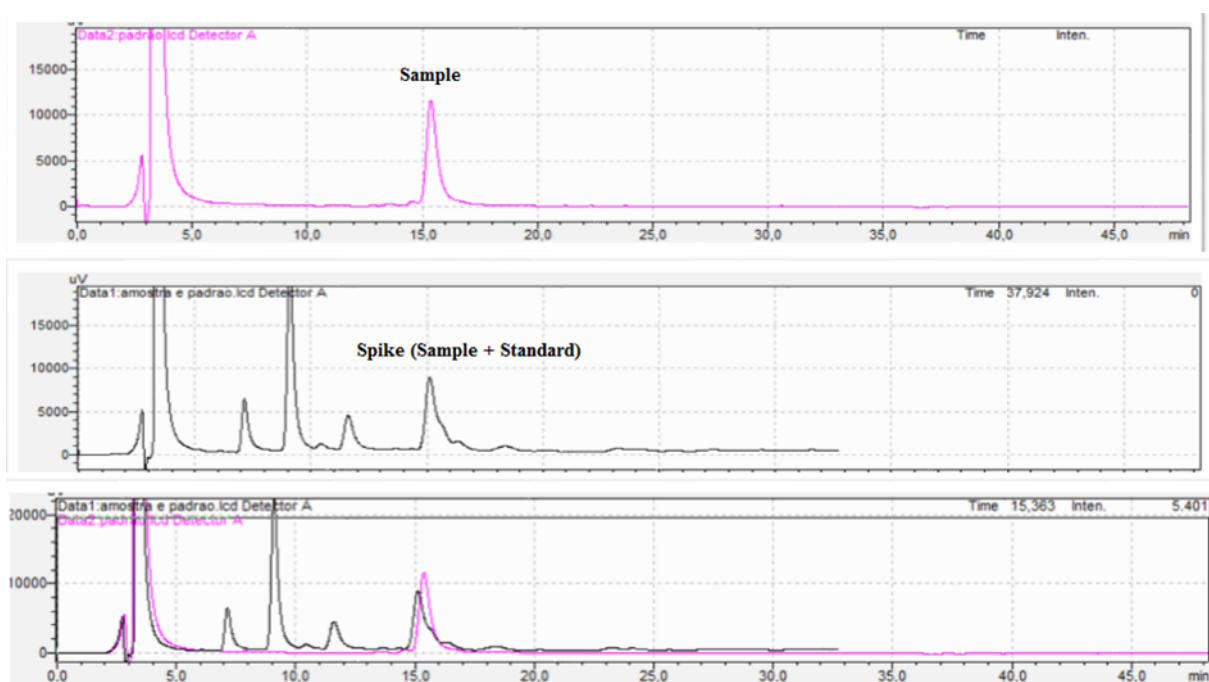


Figure S1. Chromatogram obtained by HPLC-RID of (a) sample, (b) spike - mixture of sample + lactosucrose standard and (c) overlapping of sample + lactosucrose standard. Chromatographic conditions: see text.

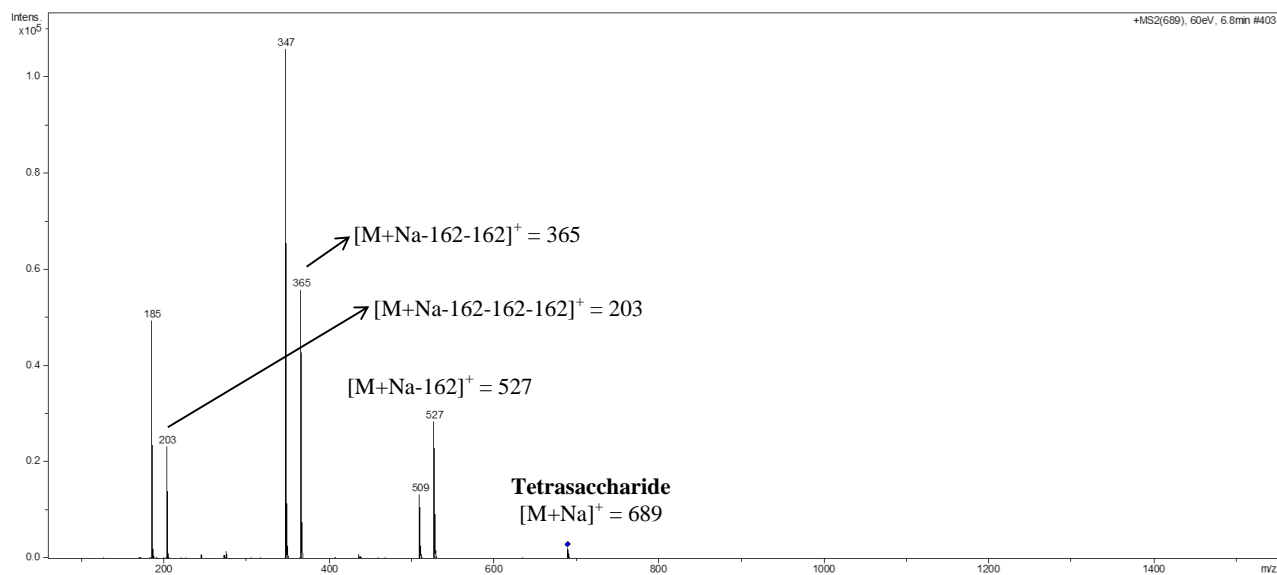


Figure S2. Tetrasaccharide ($MM = 666 \text{ g mol}^{-1}$) found in the sample: fragments from $[M+Na]^+ = 689$ (positive mode).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O objetivo principal deste trabalho foi produzir lactosacarose, um prebiótico formado a partir de lactose e sacarose. Inicialmente, foi avaliada uma β -frutofuranosidase comercial, uma vez que boa parte da literatura científica relata a produção de lactosacarose com o uso deste tipo de enzima. Foram realizados diferentes testes e verificou-se que somente parte do substrato disponibilizado, a sacarose, era consumida e, em consequência, o produto formado eram fruto-oligossacarídeos e nenhuma lactosacarose foi produzida. Em seguida iniciou-se a prospecção de outro catalisador com potencial para produzir lactosacarose. Foi selecionada então a β -galactosidase de *Bacillus circulans* que foi subsequentemente imobilizada em macroesferas de quitosana. Para isso macroesferas de quitosana foram produzidas, bem como, testes para avaliar a sua capacidade de carregamento de proteína. Foram avaliadas cargas de proteína que variaram de 25 a 400 mg/g de suporte seco. Um biocatalisador com atividade de aproximadamente 300 U/g de suporte seco foi obtido com uma concentração de 200 mg/g de proteína, considerada a melhor relação entre a carga proteica oferecida e a atividade final obtida. No entanto, boa parte do catalisador imobilizado no suporte ficou sem atividade. Foi verificado que mesmo com um rendimento de imobilização de aproximadamente 100 %, a eficiência do processo foi baixa (3,3%). Experimentos posteriores revelaram que a imobilização em quitosana proporcionou uma alta estabilidade operacional ao suporte, compensando assim a baixa eficiência do processo de imobilização. Assim, após 30 ciclos de reutilização quase 100% da atividade inicial do biocatalisador foi mantida.

A estabilidade térmica da enzima livre, da enzima imobilizada e da enzima imobilizada em presença de substrato (lactose e sacarose) foi avaliada. Verificou-se que a imobilização aumentou a estabilidade térmica da enzima e que este aumento foi ainda maior quando a o catalisador imobilizado foi incubado em presença de substrato (lactose e sacarose), mais de 4.000 vezes em relação a enzima livre. Este resultado é particularmente importante porque a estabilidade térmica reflete o reforço obtido na estrutura da enzima e, aliado aos resultados da estabilidade operacional, demonstra que o processo de imobilização permitiu a obtenção de um catalisador altamente robusto. Além disso, a avaliação da estabilidade térmica em presença de substrato é mais representativa das condições reais de utilização e

permite prever melhor o comportamento do catalisador em um processo produtivo que pode ser em batelada ou contínuo.

A síntese de lactosacarose ocorre por reação de transgalactosilação catalisada por β -galactosidase, onde um grupamento galactosil da lactose é transferido para a sacarose. A lactose também pode agir como acceptor do grupamento galactosil e formar GOS. Quando GOS e lactosacarose são aceptores de galactosil oligossacarídeos com maior grau de polimerização são formados. Ciente desses produtos formados, foi verificado os efeitos da temperatura e do pH na produção de lactosacarose, GOS e oligossacarídeos totais, tanto para enzima livre quanto para a enzima imobilizada. Foi observado que temperaturas baixas, cerca de 30 °C, produzem concentrações mais elevadas de lactosacarose, enquanto que temperaturas mais elevadas, cerca de 50 °C, aumentam a formação de GOS. Tendo em vista que o objetivo inicial do trabalho é a produção de lactosacarose, cabe destacar que na melhor condição avaliada foi possível obter 79 g.L⁻¹ deste oligossacarídeo. Entretanto no somatório final, contabilizando também a presença de outros oligossacarídeos com potencial de funcionalidade, foram obtidos 260 g.L⁻¹ de oligossacarídeos totais. Assim foi demonstrado que β -galactosidase de *B. circulans* imobilizada em quitosana é um bom biocatalisador para produção de prebióticos e que a concentração final dos diferentes oligossacarídeos componentes da mistura pode ser, ao menos em parte, dirigida pelas condições de pH e temperatura utilizadas durante a reação enzimática.

Como perspectivas futuras deste trabalho, pode-se prever:

- Imobilizar a enzima em outros suportes, utilizando além do glutaraldeído a genipina ou outros agentes de ligação e verificar a possibilidade de aumentar a eficiência da imobilização e também o rendimento da produção de lactosacarose,
- Aplicar o biocatalisador em reatores, e verificar os rendimentos da produção em processo contínuo,
- Produzir a lactosacarose com simultânea retirada de glicose do meio reacional, a fim de verificar um maior rendimento de produção,
- Realizar experimentos envolvendo mutagênese para modificar a enzima β -galactosidase a fim de direcionar a formação de produtos e melhorar os parâmetros de imobilização.