

CARACTERIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE GALACTÓOLIGOSSACARÍDEOS POR FERMENTAÇÃO SEQUENCIAL

BASSETO, Radla Zabian^{*}; CRUZ, Michele Cristina Rodrigues^{**}; ALMEIDA, Mareci Mendes de^{***}; CHIQUETTO, Nelci Catarina^{****}

Resumo

A produção de galactóoligossacarídeos por fermentação sequencial de *Penicillium* sp e *Bifidobacterium animalis subsp lactis* usando farelo de trigo enriquecido com soro de leite foi investigada. A primeira etapa da fermentação sequencial foi conduzida somente com o *Penicillium* sp em concentração inicial de lactose de 40%. A segunda etapa iniciou após seis horas, com a inoculação da *Bifidobacterium animalis sub lactis*. Foram avaliadas a conversão da lactose e a produção de oligossacarídeos por cromatografia líquida de alta eficiência. A enzima β -galactosidase apresentou atividade de transgalactosilação, sintetizando açúcares maiores que o substrato lactose, sendo estes considerados galactóoligossacarídeos. Com o processo fermentativo sequencial após 12 horas, observou-se um aumento aproximado de 60% de área dos oligossacarídeos e a redução na concentração de glicose, mostrando que a síntese de oligossacarídeos foi inibida pela presença de glicose e que a ação da *Bifidobacterium animalis sub lactis* contribuiu positivamente para a eficiência do processo. Prolongando-se o tempo de fermentação sequencial para 96 horas, houve diminuição dos monossacarídeos sem alteração dos oligossacarídeos, caracterizando uma pré-purificação do prebiótico.

Palavras-chave: β -galactosidase. Galactoligossacarídeos. Fermentação estado sólido.

^{*} Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela Universidade Estadual de Ponta Grossa; radlabassetto@hotmail.com

^{**} Mestranda em Ciência e Tecnologia de Alimentos na Universidade Estadual de Ponta Grossa; chelecruzdez@yahoo.com.br

^{***} Professora associada de Ciência e Tecnologia de Alimentos na Universidade Estadual de Ponta Grossa; mareci@uepg.br

^{****} Professora associada de Ciência e Tecnologia de Alimentos na Universidade Estadual de Ponta Grossa; Av. General Carlos Cavalcanti, 4748, 84030-900, Ponta Grossa, PR; nelcichic@yahoo.com.br

Characterization of the production of galactooligosaccharides by sequential fermentation

Abstract

*The production of galactooligosaccharides (GOS) by sequential fermentation of *Penicillium* sp and *Bifidobacterium animalis* sub. *lactis* using wheat bran enriched with whey was investigated. The first stage of sequential fermentation was conducted only using *Penicillium* sp at an initial lactose concentration of 40% (w/v). The second stage started six hours later, with inoculation of *Bifidobacterium animalis* sub. *lactis*. The conversion of lactose and production of oligosaccharides by high performance liquid chromatography were evaluated. The enzyme β -galactosidase showed transgalactosylative activity, synthesizing sugars larger than the lactose substrate, which are considered to be GOS. The sequential fermentation after 12 hours showed an increase of about 60% in the area of the oligosaccharides and a reduction in glucose concentration, demonstrating that the synthesis of oligosaccharides was inhibited by the presence of glucose and that the action of *Bifidobacterium animalis* sub. *lactis* contributed positively to the efficiency of the process. Extending the time of sequential fermentation to 96 hours decreased the monosaccharides, without altering the oligosaccharides, characterizing a prebiotic pre-purification.*

Keywords: β -galactosidase. GOS. Solid state fermentation.

1 INTRODUÇÃO

Galactóoligosacarídeos compreendem oligossacarídeos prebióticos não digeríveis (SILVA, 2008; RENHE et al., 2008; PASTORE, SANTOS; SIMIQUELI, 2009; GAGGIA; MATTARELLI; BIAVATI, 2010) e podem ser produzidos pela reação conhecida como transgalactosilação. A reação ocorre pela transferência do resíduo de açúcar que forma a porção glicona da molécula do substrato para outra molécula de lactose (WALLENFELS; MALHOTRA, 1961; AKIYAMA et al., 2001; ZHOU; CHEN, 2001).

Os galactóoligosacarídeos, considerados alimentos funcionais, são resistentes à hidrólise por enzimas digestivas e intestinais e têm efeitos fisiológicos semelhantes aos da fibra alimentar (CURDA et al., 2006). Ao serem ingeridos, contribuem de forma benéfica para o aumento da população de bifidobactérias no cólon e, por efeito antagônico, a redução de formação de metabólitos tóxicos (PASTORE; SANTOS; SIMIQUELI, 2009), desintoxicando o fígado, e por efeito benéfico, a produção de ácidos graxos de cadeia curta pelas bifidobactérias, a qual, por estímulo dos movimentos peristálticos do intestino, auxilia os processos de constipação, tem efeito anticancerígeno em razão de um aumento da imunidade celular, produção de nutrientes, pois as bifidobactérias produzem vitaminas B1, B2, B6, B12, ácido nicotínico e ácido fólico; aumento da tolerância à lactose, absorção de cálcio e digestibilidade e redução dos riscos de osteoporose (ALMEIDA; PASTORE, 2003).

Para a produção de galactóoligosacarídeos, pode-se empregar enzimas e células microbianas imobilizadas e micro-organismos específicos cultivados em meio contendo lactose. Com a hidrólise da lactose, é inevitável o acúmulo de glucose e galactose como subprodutos, e a presença

desses monossacarídeos é, geralmente, relatada como indesejável já que o objetivo é produzir tri-oligossacarídeos e moléculas maiores (GREENBERG; MAHONEY, 1983; RUSTOM; FODA; LOPES-LEIVA, 1998; MARTINS; BURKERT, 2009).

Muitos processos microbianos dependem da ação conjunta de várias espécies de micro-organismos em uma mesma cultura. De acordo com Mahoney (1998), níveis de picos de oligossacarídeos poderiam ser aumentados por remoção de glucose. Isso foi verificado pela fermentação com células de *Sterigmatomyces elviae*, cujo teor de oligossacarídeos aumentou para 64%. A formação de oligossacarídeos por β -galactosidase de *Streptococcus thermophilus* estudada por Greenberg e Mahoney (1983) diminuiu à medida que a quantidade de glucose e de galactose aumentaram. Para Rustom, Foda e Lopes-Leiva (1998), o rendimento de galactóoligossacarídeos (GOS), atinge valores máximos no início da síntese enzimática, decrescendo em seguida. Esse comportamento reflete o fato de que glucose e galactose, ao atingirem certo nível de concentração, atuam como inibidores para a formação de oligossacarídeos a partir da lactose.

No presente estudo, foi investigada a produção de galactóoligossacarídeos por fermentação sequencial de *Penicillium* sp e *Bifidobacterium animalis subsp lactis*, usando farelo de trigo enriquecido com soro de leite para o processo em fase sólida. A utilização da β -galactosidase de *Penicillium* sp deve-se ao fato de a enzima ser extracelular e não requerer nenhuma indução à sua liberação e ao seu *status Generally recognized as safe* (GRAS) (KENNEDEY, 1987; IWASHITA, 2002).

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Os reagentes utilizados foram de grau analítico. Os carboidratos utilizados como padrões foram glucose, galactose e lactose, de grau cromatográfico.

2.1 MÉTODOS

O meio de cultura utilizado para a transferência da cepa do fungo *Penicillium* sp foi o Ágar sabouraud, com pH 4,0 em Erlenmeyer de 250 mL, e o micro-organismo foi incubado por sete dias a 28 °C, para o crescimento.

Para a transferência, com objetivo de armazenamento, o meio foi preparado em tubos inclinados para se solidificar. Cada tubo inclinado continha, aproximadamente, 15 mL de meio, e as transferências eram validadas a cada dois meses.

2.1.1 Preparo do meio de cultura para fermentação no estado sólido

O substrato era composto por 10 g de farelo de trigo com adição de lactose a 2% (p/v) em água na proporção de 1:1 (p/v) e 50% de umidade. Os fermentadores foram frascos de Erlenmeyer,

com capacidade de 250 mL. O meio foi esterilizado a 121 °C por 20 minutos. Foi inoculado 1 mL da amostra com 10^8 conídios.mL⁻¹. Os frascos foram incubados a 26 °C, por sete dias.

2.1.2 Obtenção do extrato bruto de β -galactosidase e determinação da atividade enzimática

Após o crescimento do *Penicillium* SP, seguiu-se à metodologia citada por Almeida e Pastore (2003), com algumas modificações. Foram adicionados aos meios de cultivo, 50 mL da solução de soro de leite concentrado estéril. O meio foi homogeneizado com bastão de vidro para a liberação enzimática. Essa solução foi deixada em repouso por 60 minutos em banho de gelo, com agitação mecânica a cada 5 min. Após esse tempo, a solução foi homogeneizada e filtrada em papel Whatman n. 1, ainda em banho de gelo, para obtenção do extrato bruto enzimático. Para a determinação da atividade enzimática no extrato bruto, foi utilizado como substrato orto-nitrofenil-galactopiranosídeo (WALLENFELS; MALHOTRA, 1961) e foi medida em espectrofotômetro a 420 nm contra branco (PARK; DE SANTI; PASTORE, 1979). Para a realização dos cálculos de atividade enzimática, foi feita a curva de orto-nitrofenol (ONP), o produto da reação (ALMEIDA, 2003). A reação da enzima com ONPG liberando ONP é específica para determinar a atividade enzimática de β -galactosidase (RICHMOND; STINE, 1981). Uma unidade de atividade de β -galactosidase foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 μ mol de orto-nitrofenol por minuto, em 1 mL, nas condições de ensaio (WALLENFELS; MALHOTRA, 1961).

2.1.3 Síntese de gactooligossacarídeos (GOS) e fermentação sequencial

A síntese de GOS foi realizada utilizando soro concentrado de leite contendo 72% de lactose e 1,8U.mL⁻¹ de atividade hidrolítica da enzima β galactosidase. O soro concentrado desmineralizado cedido pela empresa Sooro – Concentrado Indústria de Produtos Lácteos – Ltda. foi solubilizado em água deionizada até atingir à concentração de 40% de lactose. Após a esterilização, o soro foi filtrado em papel filtro qualitativo Whatman n. 1 em decorrência da precipitação das proteínas ocorrida em razão da exposição à alta temperatura. Os ensaios foram realizados por 24 horas em banho Dubnoff, a 45 °C, em agitação pendular com 80 bpm. As amostras foram retiradas do banho, centrifugadas a 9930 g por quatro minutos, em centrífuga refrigerada Himatachi modelo CR 21GII, e foi aguardado 60 minutos para a liberação da enzima. Uma alíquota foi retirada e foi considerado como tempo zero o instante em que a amostra foi colocada na temperatura ótima de fermentação.

A fim de testar o efeito do aumento da produção de GOS pelo consumo da glucose, conduziu-se uma fermentação sequencial. A estirpe de *Bifidobacterium animalis* sub. *lactis* adquirida da Christian Hansen A/C foi utilizada em razão da sua capacidade de utilizar glucose e galactose como fontes de carbono. O inóculo foi padronizado com uma população de 10^8 cel/mL.

O *Penicillium* sp foi inoculado no meio contendo soro de leite na concentração de 40% de lactose. Após 6 horas (primeira etapa da fermentação sequencial), o pH foi corrigido para 6 com

NaOH 0,5N previamente esterilizado, e a *Bifidobacterium animalis sub.lactis* foi inoculada (segunda etapa da fermentação sequencial). O erlenmeyer de 250 mL com 50 mL de meio voltou para o banho Dubnoff, a 37 °C, sem agitação pendular, e foi feito o acompanhamento do pH. As amostras foram retiradas do banho nos tempos 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 e 24 horas e congeladas para, posteriormente, serem centrifugadas para análise qualitativa e quantitativa de carboidratos. O processo fermentativo sequencial foi acompanhado de um processo somente com o *Penicillium* sp. Os experimentos foram realizados em triplicatas.

O pH foi monitorado para verificar o efeito no crescimento da *Bifidobacterium animalis sub.lactis* na reação de hidrólise quando da associação dos micro-organismos.

2.1.4 Análise das amostras

A conversão da lactose, a produção de oligossacarídeos e ácido acético e lático foram avaliadas por cromatografia líquida de alta eficiência em cromatógrafo marca Waters 2695, com bomba peristáltica, Degasser e detector de índice de refração Waters 2414, controlados pelo software Empower – Waters. A coluna utilizada para verificar a conversão da lactose e a produção de oligossacarídeos foi a de troca iônica sugar pack (6,5 x 300 mm) da Waters modelo 085188, sendo a fase móvel água ultra pura (milli-q) filtrada e degaseificada; padrões de grau cromatográfico de glucose, galactose e lactose. A coluna cromatográfica utilizada separa os compostos pela massa molecular; sob essa condição, os picos detectados e não identificados que apresentaram menor tempo de retenção que a lactose foram considerados como tendo massa molecular semelhante ou superior a dissacarídeos, sendo nomeados de galactóoligosacarídeos.

A coluna utilizada para verificar a produção de ácido acético e lático foi a Shodex (8.0 × 300 mm) modelo KC-811, sendo a fase móvel 0,1% H₃PO₄ filtrada e degaseificada, padrões de grau cromatográfico de ácido acético, lático, succínico e fórmico.

Os padrões e as amostras foram filtrados em membrana chromafil (XTRA PA-45/25) poro 0,45m, diâmetro 25 mm, antes de serem injetados.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 CRESCIMENTO *PENICILLIUM* SP E PRODUÇÃO DE B-GALACTOSIDASE

A linhagem de *Penicillium* sp teve bom crescimento, recobrando toda superfície com esporos, no meio composto de farelo de trigo e solução de lactose 2% na proporção de 1:1 (p/v) e produziu a enzima β -galactosidase. O extrato bruto apresentou atividade enzimática igual a 1,8 U. mL⁻¹ na temperatura de 60 °C e pH 5; Schuber (2011), trabalhando com esse fungo, obteve atividade enzimática no extrato bruto cerca de 1,0 U. mL⁻¹. Tauk-Tornisielo et al. (2009) comparou a produção enzimática por *P. fellutanum* e *P. citrinum*, a 25 °C, em pH 5 por 72 horas, em meio sólido de farelo de trigo e em

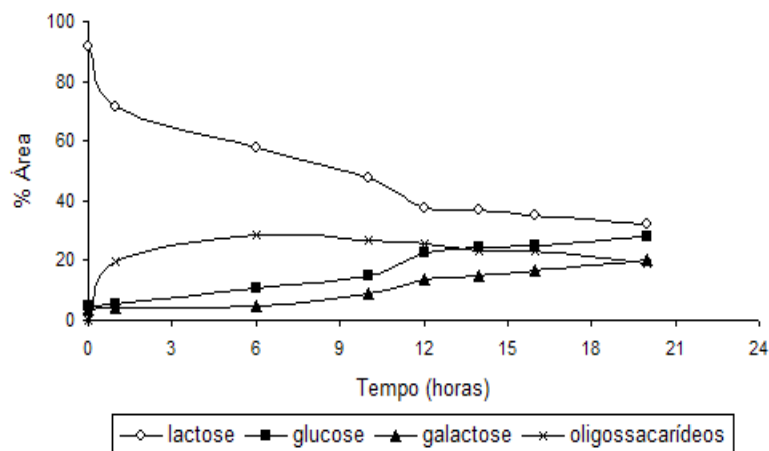
meio líquido de cultivo. O fungo crescido em meio de farelo de trigo apresentou o melhor resultado. Sua atividade enzimática foi cerca de 60% melhor do que no meio líquido.

3.2 PRIMEIRA ETAPA DA FERMENTAÇÃO SEQUENCIAL: SÍNTESE DE GOS

A síntese de GOS foi realizada utilizando células inteiras de *Penicillium* sp. Durante a conversão de lactose em galactóligossacarídeos por β -galactosidases, a hidrólise termodinamicamente favorecida da lactose gera galactose e glucose, que competem com a atividade de transferase, a qual gera uma mistura complexa de vários oligossacarídeos de diferentes estruturas (TORRES et al., 2010).

Os dados mostram que os oligossacarídeos apareceram logo que os monossacarídeos foram liberados, enquanto que a glucose e a galactose foram liberadas simultaneamente, e esta foi utilizada em maior quantidade, indicando que parte das moléculas de galactose estava sendo utilizada para sintetizar os oligossacarídeos. A porcentagem de área dos oligossacarídeos aumentou inicialmente e, subsequentemente, diminuiu quando a atividade de transgalactosilação tornou-se menos pronunciada do que a atividade hidrolítica, de acordo com os relatos na literatura (BOON; JANSSEN; VAN'T RIET, 2000). O aumento do tempo de incubação levou a um decréscimo da produção de galactóligossacarídeos (Gráfico 1), o que pode ser explicado pelo aumento da quantidade de glucose, considerado um inibidor da reação (TORRES et al., 2010; RUSTOM; FODA; LOPEZ-LENA, 1998; PRENOSIL; STUKER; BOURNE, 1987; IWASAKI; MISUTOSHI; NAKAO, 1996).

Gráfico 1 – Conversão da lactose e produção de oligossacarídeos na concentração inicial de 40% de lactose em relação ao tempo



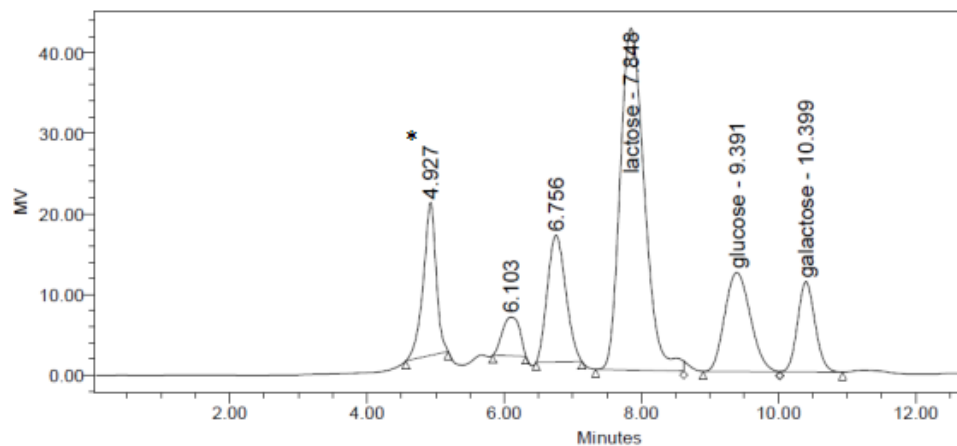
Fonte: os autores.

A porcentagem de área de oligossacarídeos diminuiu, sugerindo que estes provavelmente estavam sendo hidrolisados mais rapidamente do que estavam sendo formados. Torres et al. (2010) observou que após o ponto máximo, a concentração de galactóligossacarídeos diminuiu até aproximadamente zero, quando a conversão da lactose é de cerca de 100%. O autor afirma que o aumento da quantidade de oligossacarídeos pode ser em razão da maior capacidade da enzima para catalisar

a reação de transgalactosilação em relação à hidrólise e/ou a uma menor taxa de decomposição dos produtos de oligossacarídeos em relação à hidrólise da lactose, provavelmente por causa da constante de Michaelis–Menten, cujos valores determinados foram muito mais elevados para a lactose do que para os galactóligossacarídeos (TORRES et al., 2010).

A utilização da β -galactosidase de *Penicillium* sp. resultou na síntese de moléculas maiores que a lactose, cuja natureza não pôde ser identificada pela inexistência de padrão, que eluíram em 4,927 minutos, 6,103 minutos e 6,756 minutos (Gráfico 2). A fração de oligossacarídeos formados, possivelmente é um trissacarídeo (BERGER; LEE; LACROIX, 1995).

Gráfico 2 – Modelo de cromatograma concentração inicial de lactose de 40%, no tempo de 6 horas



Fonte: os autores.

*Os números em cima dos picos são os tempos de retenção de cada um dos açúcares.

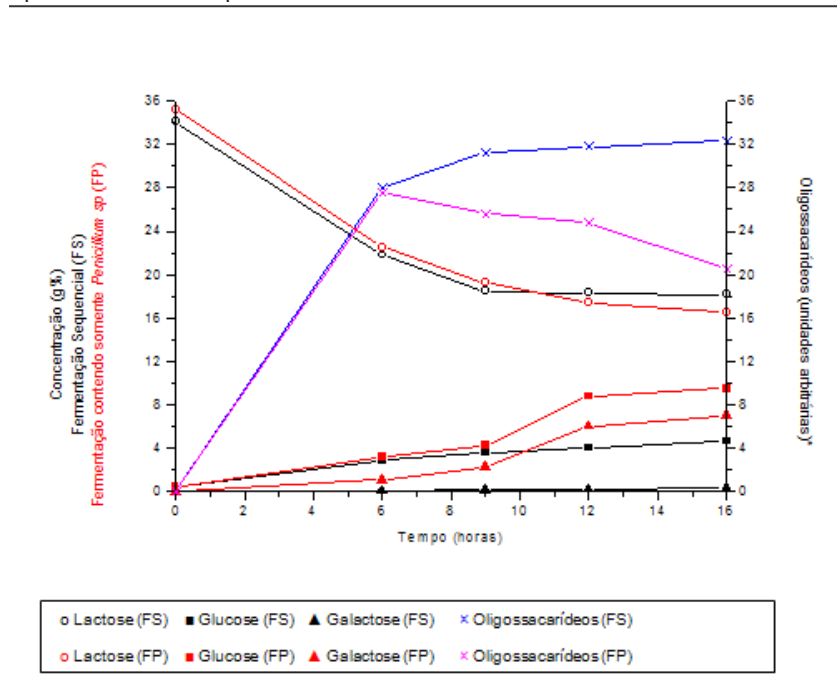
O maior rendimento de galactóligossacarídeos foi alcançado na conversão de lactose a 47% e na taxa livre de glucose para galactose de 2:1. Essa taxa livre deve ser mais elevada do que um, porque alguns resíduos de galactose produzidos pela clivagem da lactose podem ser transferidos para oligossacarídeos (TORRES et al., 2010).

3.3 SEGUNDA ETAPA DA FERMENTAÇÃO SEQUENCIAL: EFEITOS DA ASSOCIAÇÃO DOS MICRO-ORGANISMOS

O tempo de seis horas foi definido para o início da segunda etapa do processo fermentativo sequencial pelo fato de que a porcentagem de área dos oligossacarídeos começou a diminuir. Nesse tempo, a concentração de lactose era de 21,76 g% e a de glucose de 3,15 g%, equivalente à do meio de crescimento recomendado para o cultivo da *Bifidobacterium animalis* sub. *lactis*. Como a porcentagem de área de oligossacarídeos manteve-se praticamente constante após 12 horas de fermentação sequencial, esse foi o tempo total considerado ideal para esse processo fermentativo.

A concentração de oligossacarídeos, ao final de 12 horas, foi 28,8% maior do que aquela resultante da fermentação apenas com o *Penicillium* sp no mesmo período (Gráfico 3). A β -galactosidase de *Bifidobacterium* é uma enzima intracelular (NAKAKUKI, 1993). Como neste estudo foram utilizadas células inteiras, o aumento da síntese de oligossacarídeos foi influenciado pelo consumo da glucose pela *Bifidobacterium animalis* sub. *Lactis*. quando da associação dos micro-organismos. A diminuição da concentração de glucose foram duas vezes maior no processo fermentativo sequencial.

Gráfico 3 – Conversão da lactose e produção de oligossacarídeos do processo fermentativo sequencial e da fermentação que tinha apenas *Penicillium* sp.



Fonte: os autores.

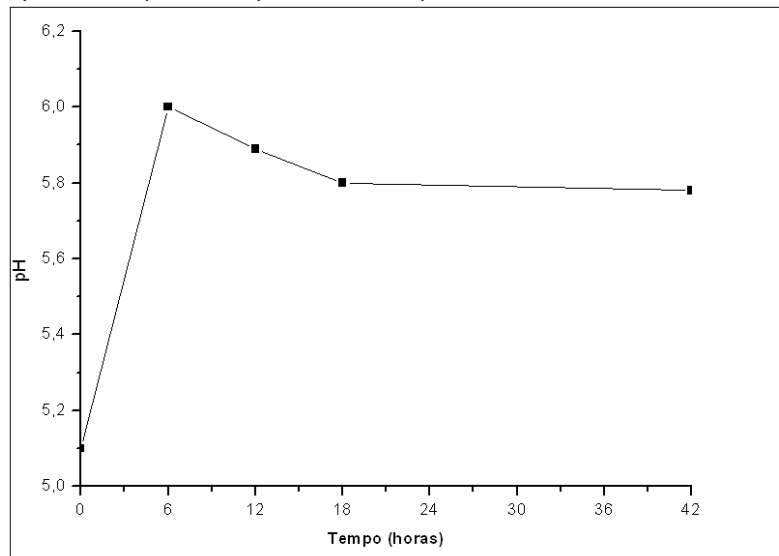
Nota: *Produção de oligossacarídeos expressa em unidades arbitrárias como a soma das áreas dos picos eluídos entre 4 e 6,75 minutos mostradas no cromatograma (Gráfico 2).

A fermentação sequencial foi prolongada até 96 horas, para que se monitorasse a variação dos carboidratos digeríveis, visando a uma pré-purificação do GOS. Houve diminuição de cerca de 40% de glucose e de galactose em 50 horas, permanecendo constante até 96 horas, sem qualquer efeito na concentração dos oligossacarídeos. Goulas, Tzortzis e Gibson (2006) avaliaram a produção de galactooligossacarídeos por células inteiras de *Bifidobacterium bifidum*, e para a purificação foi utilizada segunda fermentação com *Saccharomyces cerevisiae*. Houve diminuição de 92% de glucose no período de 32 horas sem perdas de oligossacarídeos e apenas uma pequena diminuição na galactose.

Após 42 horas de fermentação o pH era de 5,6 (Gráfico 4). Nesse período, houve produção de ácido acético e lático na proporção de 3:1. Segundo Moddler, Mickellar e Yagushi (1990), o decréscimo do pH pode ser explicado pela produção desses ácidos na proporção de 3:2 e de pequenas quantidades de ácido fórmico, etanol e ácido succínico. Essa redução no pH não teve influência no crescimento da *Bifidobacterium animalis* sub *lactis*. Cruz et al. (1999) mostraram que o pH ótimo para hidrólise foi na

faixa de 4 a 4,6, e para a atividade de galactosiltransferase na faixa de 6 a 7, a partir da β -galactosidase de *P. simplicissimum*.

Gráfico 4 – Variação do pH em relação ao tempo de fermentação



Fonte: os autores.

4 CONCLUSÃO

A enzima β -galactosidase, produzida pelo fungo *Penicillium* sp., apresentou atividade de 1,8 U.mL⁻¹ na temperatura de 60 °C e pH 5.

A síntese de GOS foi inibida pela glucose. A eficiência do processo foi melhor com a associação dos micro-organismos, pois houve consumo da glucose pela *Bifidobacterium animalis* sub. *lactis*.

Prolongando-se o tempo de fermentação sequencial até 96 horas, houve diminuição de cerca de 40% dos monossacarídeos sem alteração dos oligossacarídeos, caracterizando uma pré-purificação do prebiótico pela *Bifidobacterium animalis* sub. *lactis*.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, M. M.; PASTORE, G. M. Galactóoligosacarídeos: produção e efeitos benéficos. Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos, v. 35, n. 1-2, p. 12-19, 2001.

AKIYAMA, K. et al. Production of galactooligosaccharides from lactose using a betaglucosidase from *Thermus* sp Z-1. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 65, p. 438-441, 2001.

BERGER, J. L.; LEE, B. H.; LACROIX, C. Purification, properties and characterization of a high-molecular-mass β -galactosidase isoenzyme from *Thermus aquaticus* YT-1. **Biotechnology Applied and Biochemistry**, v. 25, p. 29-41, 1995.

BOON, M. A.; JANSSEN, A. E. M.; VAN'T RIET, K. Effect of temperature and enzyme origin on the enzymatic synthesis of oligosaccharides. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, p. 271-281, 2000.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria n. 398, de 30 de abril de 1999. **Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos ingredientes, substâncias bioativas e probióticos. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 30 abr. 1999.** Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 15 nov. 2011.

CRUZ, R. et al. Properties of a new fungal β -galactosidase with potential application in the dairy industry. **Revista de Microbiologia**, v. 30, p. 265-271, 1999.

CURDA, L. et al. Dried buttermilk containing galactooligosaccharides – process layout and its verification. **Journal of Food Engineering**, v. 77, p. 468-471, 2006.

GAGGIA, F.; MATTARELLI, P.; BIAVATI, B. Review Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production. **International Journal of Food Microbiology**, v. 141, p. S15-S28, 2010.

GOULAS, A.; TZORTZIS, G.; GIBSON, G. Development of a process for the production and purification of α - and β -galactooligosaccharides from *Bifidobacterium bifidum* NCIMB 41171. **International Dairy Journal**, v. 17, p. 648-656, 2007.

GREENBERG, N. A.; MAHONEY, R. R. Formation of oligosaccharides by β -galactosidase from streptococcus thermophilus. **Food Chemistry**, v. 10, p. 195-204, 1983.

HUBER, R. E.; KURZ, G.; WALLENFELS, K. A quantitation of the factors which affect the hydrolase and transgalactosylase activities of β -galactosidase (*E. coli*) on lactose. **Biochemistry**, v. 15, p. 1994-2001, 1976.

IWASAKI, K.; MISUTOSHI, N.; NAKAO, S. Galacto-oligosaccharide production from lactose by an enzymic batch reaction using by β -galactosidase. **Process Biochemistry**, v. 31, n. 1, p. 69-76, 1996.

IWASHITA, K. Recent Studies of protein secretion by filamentous fungi. **Journal of Bioscience Bioengineering**, v. 94, p. 530-535, 2002.

KENNEDY, E. P. Membrane derived- oligosaccharides. In: *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: Cellular and Molecular Biology. **American Society for Microbiology**, Washington: DC, v. 1, p. 636-679, 1987.

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

MARTINS, A. R.; BURKERT, C. A. V. Review Galactooligosaccharides (GOS) and their prebiotic and bifidogenic effects. **Brazilian Journal Food Technology**, v. 12, n. 3, p. 230-240, jul./set. 2009.

MODDLER, H. W.; MCKELLAR, R. C.; YAGUCHI, M. Bifidobacteria and bifidogenic factors. **Institute Food Science Technology**, v. 23, p. 29-41, 1990.

NAKAKUKI, T. **Oligosaccharides: production, properties and applications.** Gordon and Breach Science Publishers S.A., 1993.

PARK, Y. K.; DE SANTI, M. S. S.; PASTORE, G. M. Production and characterization of β -galactosidase from *Aspergillus oryzae*. *Journal Food Science*, v. 44, p. 100-103, 1979.

PASTORE, G.; SANTOS, R.; SIMIQUÉLI, A. Produção de galactooligossacarídeo por *Scopulariopsis* sp. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, p. 682-689, 2009.

PRENOSIL, J. E.; STUKER, E.; BOURNE, J. R. Formation of oligosaccharides during enzymatic lactose hydrolysis and their importance in a whey hydrolysis process: part II: experimental. *Biotechnology Bioengineering*, v. 30, p. 1026-1031, 1987.

ONISHI, N.; YOKOZEKI, K. Gluco-oligosaccharide and galacto-oligosaccharide production by *Rhodotorula minuta* IFO879. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 82, p. 124-127, 1996.

OSMAN, A. et al. A comprehensive investigation of the synthesis of prebiotic galactooligosaccharides by whole cells of *Bifidobacterium bifidum* NCIMB 41171. **Journal of Biotechnology**, v. 150, p. 140-148, 2010.

RENHE, I. R. T. et al. Prebióticos e os benefícios de seu consumo na saúde. **Revista Brasileira Nutrição Clínica**, v. 23, p. 119-26, 2008.

RICHMOND, M. L.; STINE, C. M. β -galactosidase: review of recent research related to technological applications, nutritional concerns, and immobilization. **Journal of Dairy Science**, v. 64, p. 1579-1771, 1981.

RUSTOM, I.; FODA, M.; LOPEZ-LEIVA, M. H. Formation of oligosaccharides from whey UF-permeate by enzymatic hydrolysis-analysis of factors. **Food Chemistry**, v. 62, n. 2, p. 141-147, 1998.

SCHUBER, L. C. L. **Seleção de microrganismos produtores de β -galactosidase para síntese de galactooligossacarídeos.** 2011. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos)–Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2011.

SILVA, J. P. **Seleção de microrganismos osmofílicos isolados de favo-de-mel para produção de frutooligossacarídeos por fermentação.** 2008. 69 p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimento)–Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.

TAUK-TORNISIELO, S. M. et al. Lipid formation and α -linolenic acid production by *Mucor circinelloides* and *Rhizopus* sp., grown on vegetable oil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, p. 342-345, 2009.

TORRES, D. P. M. et al. Galacto-Oligosaccharides: Production, Properties, Applications, and Significance as Prebiotics. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 9, p. 438-454, 2010.

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

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

Agradecimentos

Este estudo foi financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes).

Recebido em 21 de janeiro de 2014

Aceito em 09 de abril de 2014