

# PERFIL CINÉTICO DE GALACTOOLIGOSSACARÍDEOS PRODUZIDOS POR $\beta$ -GALACTOSIDASE DE *KLUYVEROMYCES LACTIS*

Data de aceite: 01/04/2024

### Adriana A. B. Tomal

Universidade do Estado de Minas Gerais (UEMG); Departamento de Ciências Naturais e da Terra. Divinópolis – MG. Brasil  
<https://orcid.org/0000-0002-3764-6820>

### Alessandra Bosso

Universidade Estadual de Londrina; Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Centro de Ciências Agrárias. Londrina -PR. Brasil  
<https://orcid.org/0000-000-1591-3737>

### Raúl Jorge Hernan Castro Gómez

Universidade Estadual de Londrina; Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Centro de Ciências Agrárias. Londrina -PR. Brasil  
<https://orcid.org/0000-0001-5773-1654>

mesmas condições. Os carboidratos foram quantificados por cromatografia líquida alta eficiência de troca iônica acoplado com detector de pulso amperométrico (HPEAC-PAD). A utilização da enzima *K. lactis* revelou produzir dez vezes mais GOS<sub>i</sub> no soro de leite do que na lactose pura, sendo 34.65 g/L e 3.63 g/L, respectivamente após 120 minutos de reação. Quanto ao perfil cinético, foi observado que a enzima de *K. lactis* converteu 90.01% da lactose, sendo que aos 240 minutos de reação, a lactose foi completamente convertida, e quando comparado o perfil cinético utilizando lactose pura nas mesmas condições reacionais, houve a conversão de apenas 20% da lactose, produzindo 3.87 g/L de GOS<sub>i</sub>. O produto obtido da produção de GOS a partir do soro de leite com enzima  $\beta$ -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* mostrou ser uma alternativa de ingrediente em alimentos funcionais com quantidade significativa de GOS e baixo teor de lactose. **PALAVRAS-CHAVE:** Alimento funcional, hidrólise da lactose, soro de leite, transgalactosilação

**RESUMO:** O objetivo deste trabalho foi realizar um estudo cinético da produção de galactooligoossacarídeos (GOS) a partir de soro de leite por  $\beta$ -galactosidase de *Kluyveromyces lactis*. Os experimentos foram conduzidos em condições otimizadas das enzimas para a produção de GOS (GOS<sub>i</sub>) e rendimento de GOS (Y) em soro de leite e comparados com lactose pura nas

## KINETIC PROFILE OF GALACTOOLIGOSACCHARIDES PRODUCED BY $\beta$ -GALACTOSIDASE FROM *KLUYVEROMYCES LACTIS*

**ABSTRACT:** The objective of this work was to carry out a kinetic study of the production of galactooligosaccharides (GOS) from whey by  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. The experiments were conducted under optimized enzyme conditions for GOS production (GOS<sub>t</sub>) and GOS yield (Y) in whey and compared with pure lactose under the same conditions. Carbohydrates carbohydrate were quantified by by high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection (HPAE-PAD). The use of the *K. lactis* enzyme revealed to produce ten times more GOS<sub>t</sub> in whey than in pure lactose, being 34.65 g/L and 3.63 g/L, respectively after 120 minutes of reaction. As for the kinetic profile, it was observed that the *K. lactis* enzyme converted 90.01% of the lactose, and after 240 minutes of reaction, the lactose was completely converted, and when comparing the kinetic profile using pure lactose under the same reaction conditions, there was a conversion of only 20% of the lactose, producing 3.87 g/L of GOS<sub>t</sub>. The product obtained from the production of GOS from whey with the enzyme  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* proved to be an alternative ingredient in functional foods with a significant amount of GOS and low lactose content.

**KEYWORDS:** Functional food, lactose hydrolysis, whey, transgalactosylation

### INTRODUÇÃO

Os oligossacarídeos são açúcares encontrados como componentes naturais em alguns alimentos e também podem ser sintetizados enzimaticamente (Jovanovic-Malinovska, Kuzmanova e Winkelhausen, 2015; Dwivedi et al., 2014; García-Cayuela, Díez-Municio e Herrero, 2014). Muitos destes oligossacarídeos são classificados como prebióticos, que são componentes alimentares não digeríveis que atuam seletivamente na proliferação ou atividade de populações de bactérias desejáveis no cólon, conferindo benefícios à saúde (Gibson et al., 2017; White e Hekmat, 2018). Este conceito abrange todas as bactérias promotoras da saúde que podem ser impactadas pelos prebióticos não apenas no intestino grosso, mas também em todo o trato gastrointestinal, que compreende desde a cavidade oral até o reto, o trato urogenital e a pele (Scott et al., 2020).

Entre os oligossacarídeos prebióticos, destacam-se os galactooligosacarídeos (GOS). Os GOS são compostos por moléculas de galactose e uma molécula de glicose ligadas através de ligações glicosídicas, sendo formados por tri- a hexassacarídeos com 2-5 unidades de galactose (Scott et al., 2020). Os GOS são produzidos a partir de soluções com altas concentrações de lactose por atividade de transgalactosilação, pela  $\beta$ -galactosidase de diversas fontes (Fai et al., 2014; Intanon et al., 2014; Michelon et al., 2014; Park e Oh, 2010).

A conversão da lactose em GOS por ação da enzima  $\beta$ -galactosidase é uma reação cineticamente controlada e responde a um modelo de competição entre a reação de transgalactosilação e hidrólise. No primeiro momento ocorre a formação de um complexo enzima-galactosil e a liberação da glicose, em seguida o complexo enzima-galactosil é

transferido para um acceptor que contenha um grupo hidroxila. Quando a transferência é feita para a lactose ocorre a transgalactosilação e se a transferência é feita para a água, a reação é de hidrólise (Akiyama et al., 2001).

Para uma síntese efetiva de galactooligossacarídeos, além das condições ambientais como temperatura, pH e concentração do substrato, há estudos de  $\beta$ -galactosidases termicamente estáveis e com alta capacidade de transgalactosilação (Mahoney, 1998). A fonte preferida de  $\beta$ -galactosidase para aplicações biotecnológicas é a microbiana, incluindo fungos filamentosos (Fai et al., 2014; Santos, Simiqueli e Pastore, 2009), leveduras (Petrova e Kujumdzieva, 2010) e bactérias (Gosling et al., 2009); as condições ótimas do processo variam de acordo com o micro-organismo em que a enzima foi extraída (Frenzel et al., 2015; Rodriguez-Colinas et al., 2014).

Estudos têm demonstrado que  $\beta$ -galactosidases de fontes distintas utilizadas na produção de GOS, diferem quanto a seletividade à água, à moléculas de açúcar, ao substrato utilizado como fonte de lactose e que mesmo em concentrações iguais de lactose inicial, resultam em rendimentos de GOS, estruturas e tipos de ligações glicosídicas diferentes (Gosling et al., 2010; Otieno 2010), formando GOS com propriedades prebióticas diferentes (Depeint et al., 2008).

Os trissacarídeos são os GOS formados em maior proporção na transgalactosilação (Cardelle-Cobas et al., 2008; Martinez-Villaluenga et al., 2008), mas diferem quanto à ligação glicosídica.  $\beta$ -galactosidases de *A. oryzae* e *K. lactis* produzem preferencialmente GOS com ligações glicosídicas  $\beta$ 1-6, formando 6'-galactosil-lactose como produto principal (Gosling et al., 2010), enquanto  $\beta$ -galactosidase de *B. circulans* produz predominantemente GOS com ligações glicosídicas  $\beta$ 1-4 formando principalmente 4'-galactosil-lactose (Rodriguez-Colinas et al., 2012). A  $\beta$ -galactosidase de *K. lactis* difere de *A. oryzae* quanto a composição geral de GOS, formando oligossacarídeos de maior peso molecular e dissacarídeos diferentes da lactose, além do trissacarídeo 6'-galactosil-lactose (Martinez-Villaluenga et al., 2008; Urrutia et al., 2013).

Neste trabalho, foi realizado um estudo cinético da produção de GOS a partir do soro de leite utilizando enzima  $\beta$ -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* e *Aspergillus oryzae*, com o objetivo de desenvolver uma estratégia para a obtenção de produtos lácteos com uma quantidade significativa de GOS e, ao mesmo tempo, com baixo teor de lactose.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Materiais

O soro de leite em pó integral foi utilizado como matéria prima e adquirido da empresa Confepar® (Londrina, Brasil) e armazenado à temperatura de 4 °C até seu uso.

A enzima utilizada foi  $\beta$ -galactosidase comercial de *Kluyveromyces lactis* maxilact® LX 5000 (DSM FOOD SPECIALITIES), armazenada a 4 °C até a utilização.

Os reagentes utilizados foram de grau analítico. Os carboidratos utilizados como padrões foram lactose ( $\beta$ -D-galactopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)-D-glicose) Sigma, glicose (D(+)-Glicose) Sigma, galactose (D(+)-Galactose) Sigma e 6'-galactosil-lactose (GOS  $\beta$ -1,6), Carbosynth (Berkshire, UK), de grau cromatográfico.

### Métodos

#### Formação de galactooligossacarídeos a partir do soro de leite

As reações de síntese enzimática de GOS com a enzima  $\beta$ -galactosidase de *K. lactis* foram realizadas em meio aquoso. As condições de incubação foram definidas de acordo com os resultados anteriores não apresentados. O sistema reacional utilizando  $\beta$ -galactosidase de *K. lactis* (15 U/mL) foi composto por 400 g/L de soro de leite integral reidratado em tampão fosfato de sódio 0,1M a pH 6.0.

Os frascos foram dispostos em incubadora rotatória orbital (Tecnal, modelo TE- 421) sob agitação de 180 rpm, temperatura de 40 °C para *K. lactis*. O volume total utilizado foi de 100 mL, acondicionados em erlenmeyers de 250 mL de capacidade. Alíquotas de 5 mL foram coletadas a cada meia hora até duas horas de reação e após as alíquotas foram retiradas a cada uma hora até totalizar 6 horas de reação, em seguida foram inativadas em banho-maria a uma temperatura de 100°C por 5 min e posteriormente congeladas até a quantificação dos açúcares por HPAEC-PAD.

A síntese de GOS foi avaliada pelos parâmetros: produção de GOS total (GOS<sub>t</sub>), rendimento de GOS<sub>t</sub> (Y), conversão de lactose, glicose e galactose livres.

A produção de GOS total (GOS<sub>t</sub>), rendimento da produção de GOS<sub>t</sub> (Y), conversão de lactose e produtividade foram calculados de acordo com a Tomal (2015)

### Análise estatística

Foi realizado teste-t de Student nas comparações entre os parâmetros da produção de galactooligossacarídeos (GOS) sintetizados a partir dos substratos soro de leite ou lactose pura para a enzima originada de *K. lactis*, considerando  $p < 0,05$  para significância estatística.

Os dados obtidos foram tratados no software Estatística 7.0 (StatSoft®).

## Quantificação dos carboidratos (HPAEC-PAD)

As amostras obtidas foram filtradas em membrana hidrofílica PVDF de 0,22  $\mu\text{m}$  de tamanho de poro (Millipore, Billerica, MA, EUA) e analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência de troca iônica (HPAEC-PAD, modelo 5000 ICS, Dionex Canada Ltd., Oakville, Canada). Alíquotas (10  $\mu\text{l}$ ) do filtrado foram automaticamente injetadas no sistema cromatográfico e os carboidratos foram separados pela coluna analítica CarboPac® PA1 (250 mm x 4 mm; 10  $\mu\text{m}$  de tamanho de partícula; Dionex Corporation, Sunnyvale, CA, EUA) precedido por uma pré-coluna CarboPac® PA1 (50 mm x 4 mm). As corridas cromatográficas foram realizadas a uma vazão de 1 mL/min a 25 °C. A quantificação dos açúcares foi feita por meio de calibrações externas a partir de soluções-padrão de galactose (1 a 40  $\mu\text{g/mL}$ ), glicose (0,5 a 50  $\mu\text{g/mL}$ ), lactose (0,5 a 150  $\mu\text{g/mL}$ ) e 6'-galactosil-lactose (3 a 55  $\mu\text{g/mL}$ ). Os padrões também foram utilizados para identificar os carboidratos com base nos seus tempos de retenção. A aquisição e tratamento dos dados foram realizados utilizando o software Chromeleon versão 6.8 (Dionex Corporation).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Comparação da produção de GOS a partir de soro de leite ou lactose

Foi realizado um estudo comparativo afim de investigar a influência da composição dos substratos soro de leite e lactose PA na produção de GOS.

Foi utilizado 400g/L de soro de leite contendo 68,28% de lactose (Tabela 2) e a mesma proporção deste carboidrato foi utilizada na produção de GOS por lactose pura. A reação ocorreu por 120 minutos em pH 6.0 e temperatura de 40 °C. As condições de síntese de GOS<sub>1</sub> utilizadas neste trabalho foram previamente estudadas pelos autores.

Os parâmetros avaliados na comparação da utilização de soro de leite e lactose pura foram, produção de GOS<sub>1</sub>, conversão da lactose, rendimento (Y) e produtividade da síntese de galactooligossacarídeos (Tabela. 2).

Substrato	GOS <sub>1</sub> (g/L)	Conversão de lactose (%)	Y (%)	Produtividade (g/L/h)
Soro de Leite	34.65 ± 1.75 <sup>a</sup>	90.10 ± 1.24 <sup>a</sup>	14.04 ± 0.62 <sup>a</sup>	0.288 ± 0.047 <sup>a</sup>
Lactose Pura	3.63 ± 0.11 <sup>b</sup>	19.49 ± 0.99 <sup>b</sup>	1.77 ± 0.05 <sup>b</sup>	0.030 ± 0.002 <sup>b</sup>

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística para teste-t ( $p < 0.05$ ).

Tabela 2. Comparação da utilização de soro de leite e lactose pura sobre a produção de GOS<sub>1</sub>, conversão de lactose, rendimento (Y) e produtividade da síntese de galactooligossacarídeos totais de  $\beta$ -galactosidases de *Aspergillus oryzae* ou *Kluyveromyces lactis*.

Foi possível observar uma diferença estatística para o teste-t ( $p > 0.05$ ), ressaltando que a produção de GOS<sub>t</sub> foi inferior quando se utilizou lactose pura como substrato. Essa redução é observada também em todos os outros parâmetros estudados. A dependência da enzima  $\beta$ -galactosidase de *K. lactis* frente os minerais presentes no soro de leite é evidenciada pelos resultados obtidos.

Os resultados deste trabalho corroboram com os estudos de Fischer e Kleinschmidt (2015) que analisaram a influência dos íons Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup> e Ca<sup>2+</sup> na atividade da enzima  $\beta$ -galactosidase de *A. oryzae* e os resultados indicaram que os íons testados não afetaram a atividade da enzima, mostrando que a mesma não possui dependência dos íons presentes no meio, o que torna o soro de leite uma alternativa viável para produção de GOS<sub>t</sub>. Já para a enzima *K. lactis* os autores relataram que a atividade da enzima  $\beta$ -galactosidase é fortemente ativada na presença de Na<sup>+</sup>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup> e K<sup>+</sup>.

### Perfil cinético da produção de GOS<sub>t</sub>

As mesmas condições reacionais utilizadas no estudo de comparação entre os substratos foram utilizadas no estudo da cinética.

A Figura 1 mostra a cinética da síntese de GOS<sub>t</sub> para a enzima *K. lactis* tendo o soro de leite como substrato.

Observou-se que a máxima produção de GOS<sub>t</sub> foi após 120 minutos de reação, levando a uma redução na concentração de GOS imediatamente após este tempo. Este fato se dá pela hidrólise do próprio GOS formado devido a especificidade da enzima e a diminuição da lactose no meio reacional. A concentração de lactose foi completamente hidrolisada após 240 minutos de reação.

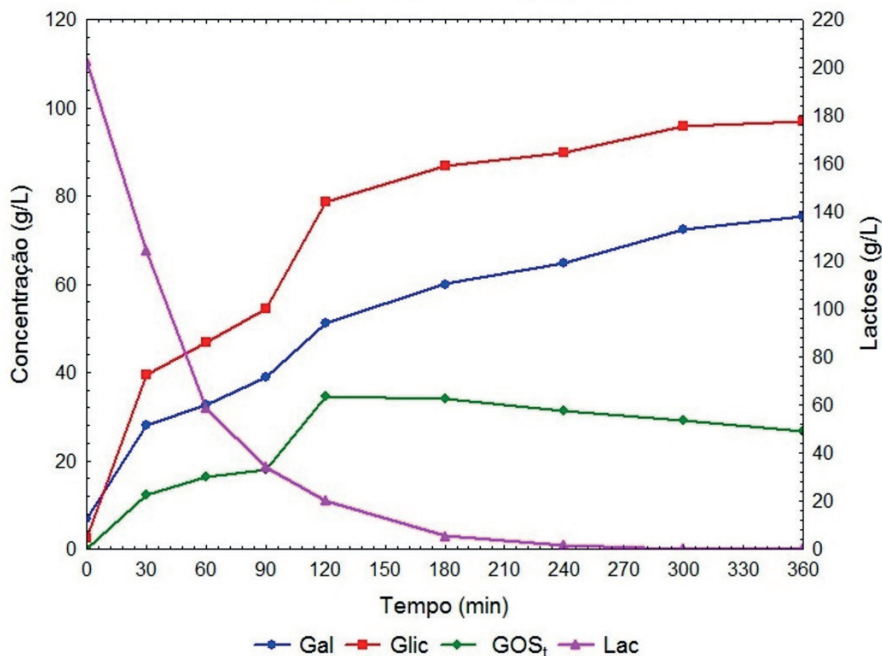


Figura 1. Concentração de glicose, galactose, lactose e GOS<sub>1</sub> em função do tempo de reação para β-galactosidase de *Kluyveromyces lactis*.

Hsu, Lee e Chou (2007) relataram que o acúmulo de glicose e galactose no meio reacional atuam como inibidores de diferentes fontes de β-galactosidas. Cruz et al. (1999) apresentaram que a síntese de oligossacarídeos por β-galactosidase de *Penicillium simplicissimum* foi fortemente inibida quando os monossacarídeos atingiram concentrações próximas a de GOS (cerca de 180 g/L). Mateo et al. (2007) relataram que as β-galactosidas de *Kluyveromyces* spp são inibidas por galactose (inibição competitiva) e glicose (inibição não competitiva). Os monossacarídeos glicose e principalmente galactose são reconhecidos como inibidores da reação de transgalactosilação. A inibição da galactose é resultado de uma competição com a lactose pelo sítio ativo da β-galactosidase, uma vez que esta enzima pode formar o complexo enzima-galactosil. O mecanismo de inibição pela glicose é mais complexo, e dependendo da fonte da enzima pode ser competitivo ou não competitivo (Gosling et al., 2010; Park e Oh, 2010).

A Figura 2 mostra os cromatogramas por HPAEC-PAD da reação do soro de leite com a enzima β-galactosidase de *Kluyveromyces lactis* no ponto de máxima concentração de GOS. Os picos 1, 2, 5 e 6 correspondem a galactose, glicose, lactose e 6'-galactosil-lactose (GOS β-1,6), respectivamente.

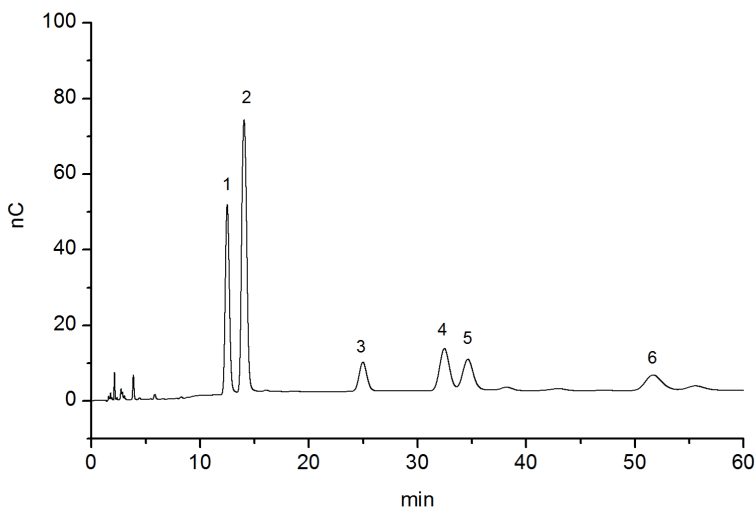
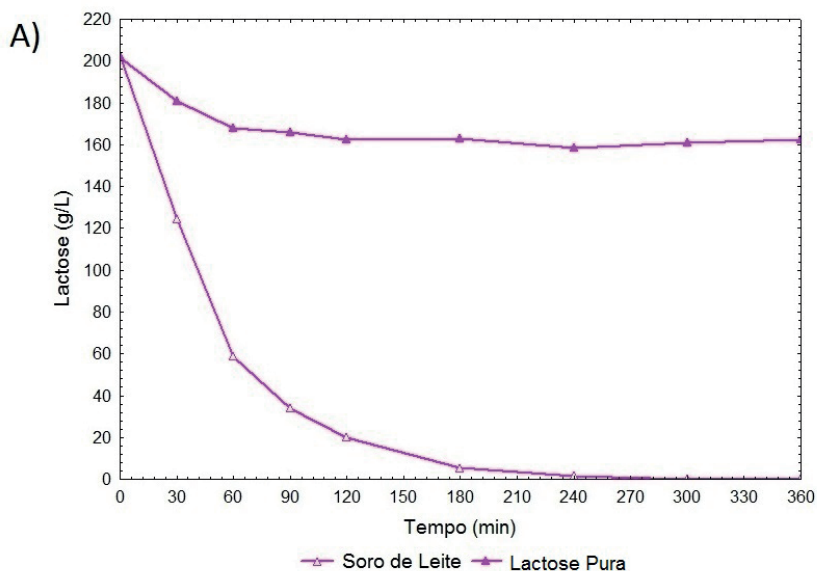


Figura 2. Cromatogramas por HPAEC-PAD da reação do soro de leite com a enzima  $\beta$ -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* (15U/mL), 400 g/L de soro de leite, 45 °C e pH 6,0. Os picos correspondem a: (1) Galactose, (2) Glicose, (5) lactose e (6) 6'-galactosil-lactose.

### Comparação cinética utilizando substratos soro de leite e lactose pura por *K. Lactis*

Baseado nos resultados da Tabela 3 onde a produção de GOS<sub>i</sub> por *K. lactis* utilizando soro de leite foi superior à lactose pura, foi realizado o estudo comparativo entre as duas fontes.





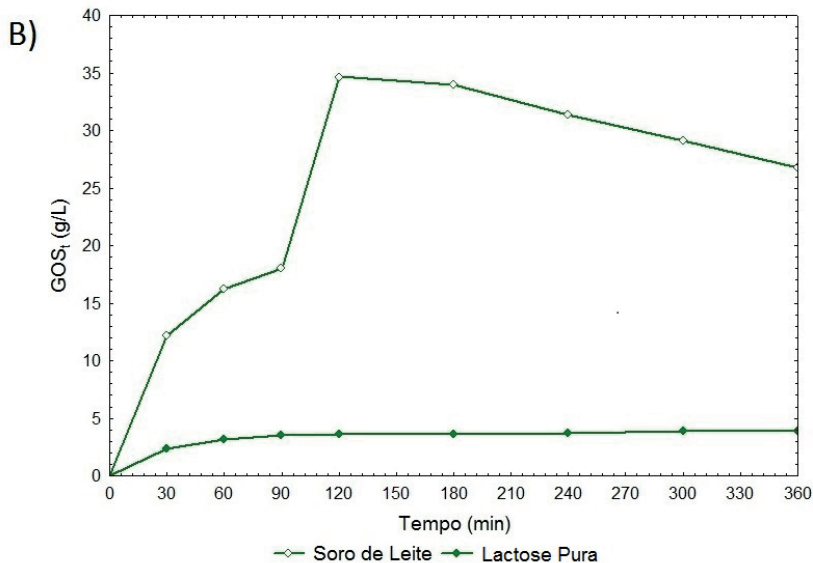


Figura 3. Comparação do consumo de lactose (A) e produção de galactooligossacarídeos totais (B) da ação de  $\beta$ -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* sobre os substratos soro de leite e lactose pura.

Quando comparado o perfil cinético da ação da enzima *K. lactis* sobre o soro de leite e a lactose pura (Fig 3A), foi possível observar que a máxima hidrólise da lactose foi após 120 minutos de reação para a lactose pura, convertendo apenas 19.59% da lactose inicial, permanecendo constante até os 360 min de reação. Entretanto, para o mesmo tempo de hidrólise de lactose no soro de leite foi de 90.10%, chegando a 99% de conversão após 240 minutos.

A produção de GOS<sub>t</sub> (Fig 3B) permaneceu constante após 60 minutos de reação, aproximadamente 3 g/L de GOS<sub>t</sub>, quando se utilizou a lactose pura como substrato, contudo, quando se utilizou soro de leite, a maior produção foi em 120 minutos de reação, chegando a 34.65 g/L de GOS<sub>t</sub>. Este resultado, como já discutido, é devido a alta dependência de minerais que atuam como cofatores enzimáticos de *K. lactis*, os quais estão presentes no soro de leite mas ausentes na solução de lactose pura.

## CONCLUSÃO

A  $\beta$ -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* demonstrou ter alta atividade hidrolítica além de quantidades adequadas de produção de galactooligossacarídeos totais quando usado o soro de leite como substrato. A enzima de *K. lactis* demonstrou ter comportamento diferente nos substratos utilizados, demonstrando ter maior atividade de transgalactosilação no soro de leite quando comparado a lactose pura.

O produto obtido da produção de GOS a partir do soro de leite com enzima  $\beta$ -galactosidase de *K. lactis* mostrou ser uma alternativa de ingrediente em alimentos funcionais com quantidade significativa de GOS e baixo teor de lactose.

## AGRADECIMENTOS

Esta pesquisa contou com apoio da Universidade do Estado de Minas Gerais - Pesquisador Produtividade da UEMG – PQ/UEMG; Universidade Estadual de Londrina e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

## REFERÊNCIAS

AKIYAMA, K., TAKASE, M., HORIKOSHI, K., SHIGEO, O. Production of galactooligosaccharides from lactose using a  $\beta$ -glucosidase from *Thermus* sp. Z-1. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, v. 65, p. 438-44, 2001.

AOAC. Official Methods of Analysis of AOAC Intl. official method 2001. 02 trans-Galactooligosaccharides (TGOS),” in *Selected Food Products*, AOAC International, Gaithersburg, Md, USA. 2005.

AOAC. Association of official analytical chemists. Official methods of analysis of the AOAC International. 19 ed. Arlington. 2012.

CARDELLE-COBAS, A., CORZO, N., VILLAMIEL, M., OLANO A. Isomerization of lactose-derived oligosaccharides: a case study using sodium aluminate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 56, p. 10954-10959, 2008.

CHEN, C. S., HSU, C. K., CHIANG, B. H. Optimization of the enzymic process for manufacturing low-lactose milk containing oligosaccharides. *Process Biochemistry*, v. 38, p. 801-808, 2002.

CRUZ, R., CRUZ, V. A., BELOTE, J.G., KHENAYFES, M. O., DORTA, C., OLIVEIRA, L. H. S., ARDILES, E., E GALLI, A. Production of trans-galactosylated oligosaccharides (TOS) by galactosyltransferase activity from *Penicillium simplicissimum*. *Bioresource Technology*, v. 70, p. 165-171, 1999.

DAVID, F. M., COLLAO-SAENZ, E. A., PÉREZ, J. R. O., CASTRO, A.L.A., RESENDE, H. R. A., LANDIM, A.V. Efeito da adição de soro de leite sobre a digestibilidade aparente e os parâmetros sanguíneos de vacas secas. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 62, p. 1183-1190, 2010.

DEPEINT, F., TZORTZIS, G., VULEVIC, J., l'ANSON, K., & GIBSON, G. R. Prebiotic evaluation of a novel galactooligosaccharide mixture produced by the enzymatic activity of *Bifidobacterium bifidum* NCIMB 41171, in healthy humans: a randomized, double-blind, crossover, placebo-controlled intervention study. *American Journal of Clinical Nutrition*, v. 87, p. 785-791, 2008.

DWIVEDI, S., SAHRAWAT, K., PUPPALA, N., ORTIZ, R. Plant prebiotics and human health: Biotechnology to breed prebiotic-rich nutritious food crops. *Electronic Journal of Biotechnology*, v. 17, p. 238–245, 2014.

- FAI, A. E. C., SILVA, J. B., ANDRADE, C. J.; BUTION, M.L.; PASTORE, G.M. Production of prebiotic galactooligosaccharides from lactose by *Pseudozyma tsukubaensis* and *Pichia kluyveri*. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 03, p. 343-350, 2014.
- FISCHER, C., KLEINSCHMIDT, T. Synthesis of galactooligosaccharides using sweet and acid whey as a substrate. **International Dairy Journal**, v. 48, p. 15-22, 2015.
- Frenzel, M., Zerge, K., Clawin-Radecker, I., Lorenzen, P. C. Comparison of the galactooligosaccharide forming activity of different  $\beta$ -galactosidases. **LWT- Food Science and Technology**, v. 60, p. 1068-1071, 2015.
- GARCÍA-CAYUELA, T., DÍEZ-MUNICIO, M., HERRERO, M. Selective fermentation of potential prebiotic lactosederived oligosaccharides by probiotic bacteria, **International Dairy Journal**, v. 38, p. 11-15, 2014.
- GIBSON, G. R., HUTKINS, R., SANDERS, M. E., PRESCOTT, S. L., REIMER, R. A., SALMINEN, S. J., SCOTT, K., STANTON, C., SWANSON, K. S., CANI, P. D., VERBEKE, K., REID, G. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 14, n. 8, p. 491-502, 2017.
- GOSLING, A., ALFTRÉN, J., STEVENS, G. W., BARBER, A. R.; KENTISH, S.E., GRAS, S. L. Facile pretreatment of *Bacillus circulans*  $\beta$ -Galactosidase increases the yield of galactosyl oligosaccharides in milk and lactose reaction systems. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 3366-3372, 2009.
- GOSLING, A., STEVENS, G. W., BARBER, A. R., KENTISH, S. E., GRAS, S. L. Recent advances refining galacto-oligosaccharide production from lactose. **Food Chemistry**, v. 121, p. 307- 318, 2010.
- HSU, C. A., LEE, S. L., CHOU, C. C. Enzymatic production of galactooligosaccharides by beta-galactosidase from *Bifidobacterium longum* BCRC 15708. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 2225–2230, 2007.
- HSU, C. A., YU, R. C., CHOU, C. C. Production of  $\beta$ -galactosidase by Bifidobacteria as influenced by various culture conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v.104, p. 197206, 2005.
- INTANON, M., ARREOLA, S.L., PHAM, N. H., KNEIFEL, W., HALTRICH, D., NGUYEN, T. H. Nature and biosynthesis of galacto-oligosaccharides related to oligosaccharides in human breast milk. **FEMS Microbiology Letters**, v. 353, p. 89-97, 2014.
- JOVANOVIC-MALINOVSKA, R., KUZMANOVA, S., WINKELHAUSEN, E. Application of ultrasound for enhanced extraction of prebiotic oligosaccharides from selected fruits and vegetables. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 22, p. 446-453, 2015.
- MAHONEY, R. R. Galactosyl-oligosaccharide formation during lactose hydrolysis: a review. **Food Chemistry**, v. 63, p. 147-154, 1998.
- Martinez-Villaluenga, C., Cardelle-Cobas, A., Corzo, N., Olano, A. Study of galactooligosaccharide composition in commercial fermented milks. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 21, p. 540-544, 2008.

MATEO, C., GRAZU, V., PALOMO, J. M., LOPEZ-GALLEGO, F., FERNANDEZ-LAFUENTE, R., GUISAN, J. M. Immobilization of enzymes on heterofunctional epoxy supports. **Nature Protocols**, v. 2, p. 1022–1032, 2007.

MICHELON, M., MANERA, A. P., CARVALHO, A. L., E FILHO, F. Concentration and purification of galacto-oligosaccharides using nanofiltration membranes. **Journal of Food Science and Technology**, v. 49, p. 1953-1961, 2014.

OTIENO, D. O. Synthesis of  $\beta$ -galactooligosaccharides from lactose using microbial  $\beta$ -galactosidases. **Compr Rev Food Sci Food Saf.**, v. 9, p. 471-482, 2010.

PARK, A. R., OH, D. K. Galacto-oligosaccharide production using microbial  $\beta$ -galactosidase: Current state and perspectives. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 85, p. 1279–1286, 2010.

PETROVA, V.Y., KUJUMDZIEVA, A.V. Thermotolerant yeast strains producers of galactooligosaccharides. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 24, p. 1612-1619, 2010.

RODRIGUEZ-COLINAS, B., POVEDA, A., JIMENEZ-BARBERO, 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, p. 6391- 6398, 2012.

RODRIGUEZ-COLINAS, B.; FERNANDEZ-ARROJO, L.; BALLESTEROS, A. O.; PLOU, F. J. Galactooligosaccharides formation during enzymatic hydrolysis of lactose: Towards a prebiotic-enriched milk, **Food Chemistry**, v.145, p. 388–394, 2014.

SANTOS, R., SIMIQUELI, A. P. R., PASTORE, G. M. Produção de galactooligossacarídeo por *Scopulariopsis* sp. **Ciência e Tecnologia de alimentos**, v. 29, p. 682-689, 2009.

SCOTT, K. P., GRIMALDI, R., CUNNINGHAM, M., SARBINI, S. R., WIJEYSEKERA, A., TANG, M. L. K., *et al.* Developments in understanding and applying prebiotics in research and practicedan ISAPP conference paper. **Journal of Applied Microbiology**, v.128, pp.934-949, 2020.

TOMAL, A. A. B.; **Produção de galactooligossacarídeos a partir de soro de leite utilizando  $\beta$ -galactosidase de *Aspergillus oryzae* e *Kluyveromyces lactis***. 2015. 116f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) Universidade Estadual de Londrina, Londrina- PR. 2015.

URRUTIA, P., RODRIGUEZ-COLINAS, B., FERNANDEZ-ARROJO, L., BALLESTEROS, A. O., WILSON, L., ILLANES, A., PLOU, F. J. Detailed analysis of galacto-oligosaccharides synthesis with b-gal from *Aspergillus oryzae*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, p. 1081-1087, 2013.

WHITE, J.; HEKMAT, S. Development of Probiotic Fruit Juices Using *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 Fortified with Short Chain and Long Chain Inulin Fiber. **Fermentation**, v. 4, n. 27, 2018.