



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
**FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**



# **Imobilização e Estabilização de $\beta$ -Galactosidase por Ligações Multipontuais em Duolite A568**

***Larissa Nayhara Soares Santana Falleiros***

**UBERLÂNDIA – MG**  
**JULHO DE 2012**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
**FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**



# **Imobilização e Estabilização de $\beta$ -Galactosidase por Ligações Multipontuais em Duolite A568**

Larissa Nayhara Soares Santana

Orientador: Eloízio Júlio Ribeiro (UFU)

Coorientadora: Miriam Maria de Resende (UFU)

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Engenharia Química, área de concentração em Pesquisa e Desenvolvimento de Processos Químicos.

**UBERLÂNDIA – MG**

**JULHO DE 2012**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG - Brasil

---

- F194i  
2012      Falleiros, Larissa Nayhara Soares Santana, 1988-  
         Imobilização e estabilização de  $\beta$ -galactosidase por ligações multi-  
pontuais em Duolite A568 / Larissa Nayhara Soares Santana Falleiros. -  
2012.  
         106 f. : il.  
         Orientadores: Eloizio Julio Ribeiro e Miriam Maria de Resende.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Uberlândia, Progra-  
ma de Pós-Graduação em Engenharia Química.  
         Inclui bibliografia.
1. Engenharia química - Teses. 2. Enzimas - Aplicações industriais -  
Teses. 3. Enzimas imobilizadas - Teses. I. Ribeiro, Eloizio Julio.  
II. Resende, Miriam Maria de. III. Universidade Federal de Uberlândia.  
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. IV. Título.

CDU: 66.0

---


DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE LARISSA NAYHARA SOARES SANTANA FALLEIROS SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM ENGENHARIA QUÍMICA, EM 26/07/2012.

BANCA EXAMINADORA:



---

Prof. Dr. Eloízio Júlio Ribeiro  
(Orientador – PPGEQ/UFU)



---

Prof. Dr. Miriam Maria de Resende  
(Coorientadora – PPGEQ/UFU)



---

Prof. Dr. Vicelma Luís Cardoso  
(PPGEQ/UFU)



---

Prof. Dr. Eliana Setsuko Kamimura  
(FZEA/USP)

## DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação ao meu esposo Idelmo, aos meus pais Avelino e Maria Aparecida, aos meus queridos irmãos, Karine e Alfredo pelo apoio, compreensão e amor incondicional em todos os momentos desta e de outras caminhadas. E em especial a Deus que é a maior razão do meu viver.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por esta conquista, por permitir, nestes tempos de desafios e aprendizados, descobrir amigos que são tesouros de Deus na minha vida...

Mas tudo só foi possível pelo apoio e amor da minha família...

Papai e Mamãe, muito obrigada por tudo que fizeram e fazem por mim...

Aos meus irmãos, Karine e Alfredo, por me suportar em todos os momentos...

Às minhas vovós e toda a família, pelo apoio e torcida...

Ao Idelmo, meu esposo, por fazer parte da minha vida, e à toda a sua família, pelo carinho e atenção...

Aos meus amigos que são amigos de Deus, por iluminar a minha vida...

Ao Prof. Eloízio e a Profa. Miriam pela orientação, amizade e permanente incentivo...

Aos professores e técnicos da FEQUI, pela paciência e dedicação...

Às alunas de iniciação científica Leticia e Lorrana pela toda a ajuda concedida...

À banca examinadora por terem aceitado o convite e contribuírem com o enriquecimento do trabalho...

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Uberlândia, pela oportunidade concedida.

Ao CNPQ pela confiança depositada e suporte financeiro.

A Dow Brasil S.A. pela doação da resina;

Enfim, agradeço a todos que contribuíram para a conclusão desta etapa, que é apenas o início de um novo tempo, que trará consigo muitas vitórias...

Que venha o tempo...

"Contudo, seja qual for o grau a que chegamos,  
o que importa é prosseguir decididamente."

Filipenses 3,16

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>i</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>iii</b>
<b>LISTA DE SÍMBOLOS .....</b>	<b>iv</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>v</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>vi</b>
<b>CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>CAPÍTULO 2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>4</b>
2.1 Leite .....	4
2.2 Soro lácteo.....	6
2.3 Lactose .....	11
2.4 Intolerância a lactose .....	14
2.5 Hidrólise da lactose.....	17
2.6 Enzimas.....	19
2.6.1 Enzima $\beta$ -galactosidase .....	22
2.6.1.1 Principais fontes de $\beta$ -galactosidase.....	22
2.7 Imobilização de Enzimas .....	25
2.8 Métodos de imobilização de enzimas .....	27
2.8.1 Imobilização por Adsorção Física.....	28
2.8.2 Imobilização por ligações covalentes.....	29
2.8.2.1 Ligação covalente multipontual.....	30
2.8.3 Ligação cruzada .....	33
2.9 Suportes para imobilização de enzimas .....	35
2.9.1 Imobilização em resinas .....	36
2.10 Reatores enzimáticos .....	38
2.10.1 Reatores descontínuos .....	40
2.10.2 Reatores contínuos .....	41



2.10.3 Problemas operacionais .....	42
<b>CAPÍTULO 3 – MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>43</b>
3.1 Enzima .....	43
3.2 Suporte para imobilização.....	43
3.3 Substratos .....	44
3.4 Unidade experimental .....	44
3.4.1 Reator tipo cesta (batelada) .....	45
3.4.2 Reator tipo leito fixo com reciclo (contínuo) .....	46
3.5 Preparação do biocatalisador.....	47
3.5.1 Ativação do suporte.....	47
3.5.2 Obtenção do biocatalisador .....	47
3.6 Preparação do permeado de soro de leite.....	48
3.7 Determinação da atividade de $\beta$ -galactosidase imobilizada pelo método das taxas iniciais .....	49
3.8 Influência da Etapa de Estabilização na Atividade do Biocatalisador Imobilizado .....	49
3.9 Influência do Tampão na Etapa de Estabilização do Biocatalisador Imobilizado.....	50
3.10 Efeito da adição de substrato durante o processo de imobilização.....	50
3.11 Estudo da estabilidade da $\beta$ -galactosidase imobilizada em relação ao pH.....	51
3.12 Estudo da estabilidade térmica da $\beta$ -galactosidase imobilizada na hidrólise de lactose.....	51
3.13 Estudo da estabilidade de estocagem da $\beta$ -galactosidase imobilizada .....	53
3.14 Influência da razão de reciclo na hidrólise de permeado de soro de leite em reator de leito fixo com reciclo operando em regime contínuo .....	53
3.15 Hidrólise de permeado de soro de leite em reator de leito fixo com reciclo operando em regime descontínuo .....	54
3.16 Estudo da estabilidade operacional da $\beta$ -galactosidase imobilizada .....	55

<b>CAPÍTULO 4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>56</b>
4.1 Influência da Etapa de Estabilização na Atividade do Biocatalisador Imobilizado .....	56
4.2 Influência da Composição do Tampão pH 9 na Atividade do Derivado Enzimático .....	59
4.3 Efeito da adição de substrato durante o processo de imobilização .....	59
4.3 Estudo da estabilidade da $\beta$ -galactosidase imobilizada em relação ao pH.....	61
4.4 Estudo da estabilidade térmica da $\beta$ -galactosidase imobilizada na hidrólise de lactose.....	63
4.5 Estudo da estabilidade de estocagem da $\beta$ -galactosidase imobilizada .....	74
4.6 Influência da razão de reciclo na hidrólise de permeado de soro de leite em reator de leito fixo com reciclo .....	75
4.7 Hidrólise de permeado de soro de leite em reator de leito fixo com reciclo operando em regime descontínuo .....	79
4.8 Estudo da estabilidade operacional da $\beta$ -galactosidase imobilizada .....	79
<b>CAPÍTULO 5 – CONCLUSÕES .....</b>	<b>82</b>
<b>CAPÍTULO 6 – SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS .....</b>	<b>84</b>
<b>CAPÍTULO 7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>85</b>
<b>ANEXO.....</b>	<b>107</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 – Molécula de lactose .....	12
Figura 2.2 – Estrutura molecular de $\alpha$ -lactose e $\beta$ -lactose .....	13
Figura 2.3 – Mecanismo proposto para formação de oligossacarídeos .....	17
Figura 2.4 – Processos de hidrólise da lactose .....	18
Figura 2.5 – Representação da proteína; a esquerda estrutura linear e a direita estrutura em hélice.....	20
Figura 2.6 - Métodos para imobilização de enzimas.....	28
Figura 2.7 – Efeito da imobilização na estabilidade da enzima .....	31
Figura 2.8 – Mecanismo de reação de <i>cross-linking</i> com glutaraldeído.....	34
Figura 2.9 – Tipos de reatores enzimáticos .....	39
Figura 3.1 – Resina Duolite A568 empregada para imobilização da enzima $\beta$ -galactosidase.....	43
Figura 3.2 – Reator tipo cesta.....	45
Figura 3.3 – Reatores tipo cesta montados em série utilizando o mesmo banho termostatizado .....	46
Figura 3.4 –Reator de leito fixo com reciclo .....	47
Figura 3.5 – Reator de leito fixo com reciclo .....	54
Figura 4.1 – Influencia do pH na estabilidade da $\beta$ -galactosidase imobilizada.....	62
Figura 4.2 - Perfis de inativação térmica para $\beta$ -galactosidase imobilizada. ....	64
Figura 4.3 - Perfil de inativação térmica a 65°C e pH 4,5 (tampão acetato 0,1 M) para $\beta$ -galactosidase imobilizada. Ajuste de modelo matemático aos dados experimentais: (—) Equação 3.1= modelo de desativação térmica de primeira ordem; (----) Equação 3.2= modelo de desativação térmica em série em uma única etapa .....	67
Figura 4.4- Perfil de inativação térmica a 62,5°C e pH 4,5 (tampão acetato 0,1 M) para $\beta$ -galactosidase imobilizada. Ajuste de modelo matemático aos dados experimentais: (—) Equação 3.1= modelo de desativação térmica de primeira ordem; (----) Equação 3.2= modelo de desativação térmica em série em uma única etapa .....	68
Figura 4.5 - Perfil de inativação térmica a 60°C e pH 4,5 (tampão acetato 0,1 M) para $\beta$ -galactosidase imobilizada. Ajuste de modelo matemático aos dados experimentais na faixa de 30 a 60 minutos: (—) Equação 3.1= modelo de desativação térmica de primeira ordem; (----) Equação 3.2= modelo de desativação térmica em série em uma única etapa .....	69
Figura 4.6 - Perfil de inativação térmica a 57,5°C e pH 4,5 (tampão acetato 0,1 M) para $\beta$ -galactosidase imobilizada. Ajuste de modelo matemático aos dados experimentais na	

faixa de 30 a 105 minutos: (—) Equação 3.1= modelo de desativação térmica de primeira ordem; (---) Equação 3.2= modelo de desativação térmica em série em uma única etapa.	70
Figura 4.7 - Perfil de inativação térmica a 55°C e pH 4,5 (tampão acetato 0,1 M) para $\beta$ -galactosidase imobilizada. Ajuste de modelo matemático aos dados experimentais na faixa de 40 a 140 minutos: (—) Equação 3.1= modelo de desativação térmica de primeira ordem; (---) Equação 3.2= modelo de desativação térmica em série em uma única etapa.	71
Figura 4.8 – Ajuste do modelo de Arrhenius (—) aos dados experimentais (valores de $k_d$ ) ...	73
Figura 4.9 - Estabilidade de estocagem da $\beta$ -galactosidase imobilizada. ....	74
Figura 4.10 - Aumento da conversão global em relação à conversão por passe em função da vazão de reciclo .....	77
Figura 4.11 - Estabilidade operacional da $\beta$ -galactosidase imobilizada na hidrólise de lactose em reator de leito fixo com reciclo em regime contínuo. ....	80

## LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 - Composição média do leite de vaca.....	5
Tabela 2.2 – Composição do leite integral, leite desnatado e do soro de leite doce e ácido.....	8
Tabela 2.3 – Poder adoçante relativo e solubilidade de alguns dissacarídeos e monossacarídeos.....	11
Tabela 2.4 – Classificação das enzimas .....	21
Tabela 2.5 – Possíveis fontes de obtenção de $\beta$ -galactosidase .....	23
Tabela 2.6 – Propriedades de algumas lactases microbianas .....	24
Tabela 3.1 – Características da resina Duolite A568 (Rohm Hass).....	44
Tabela 4.1 – Resultado de atividade enzimática em relação à atividade enzimática alcançada pelo biocatalisador imobilizado por adsorção e ligação cruzada .....	56
Tabela 4.2 – Atividade enzimática obtida ao final de cada etapa de obtenção do biocatalisador .....	57
Tabela 4.3 – Resultado para a dosagem de proteína e atividade enzimática para estudo da influência do tampão utilizado na etapa de estabilização .....	58
Tabela 4.4– Resultado para atividade enzimática e rendimento de imobilização .....	58
Tabela 4.5 – Resultado da influência da composição do tampão pH 9 na atividade enzimática .....	59
Tabela 4.6 – Resultado do efeito da adição de substrato no processo de imobilização .....	60
Tabela 4.7 - Ajustes dos dados experimentais aos modelos de desativação térmica de primeira ordem e em série em uma única etapa para $\beta$ -galactosidase imobilizada .....	66
Tabela 4.8 - Valores de $k_d$ e tempos de meia-vida calculados pelo modelo de primeira ordem de desativação térmica .....	72
Tabela 4.9 – Conversão de lactose por passe e global em reator de leite fixo com reciclo em função da vazão de reciclo utilizando permeado de soro com concentração de lactose 50 g/L.....	76
Tabela 4.10 – Conversão de lactose por passe e global em reator de leite fixo com razão de reciclo igual a 0,5 utilizando permeado de soro com concentração de lactose 50 g/L.....	77
Tabela 4.11 – Conversão de lactose em permeado de soro (50 g/L de lactose) em reator de leite fixo com vazão de 1 mL/min operando em regime descontínuo ( <i>loop</i> ).....	79

## LISTA DE SÍMBOLOS

---

$\beta$	Beta - formas anoméricas da enzima $\beta$ -galactosidase
$\alpha$	Alfa - formas anoméricas da enzima $\beta$ -galactosidase
$E_a$	Energia de ativação do processo de ativação térmica da enzima
$T$	Temperatura absoluta (K)
$A$	Atividade enzimática
$A_0$	Atividade enzimática inicial
$A/A_0$	Atividade enzimática em relação à inicial
$\alpha_l = E_l / E$	Razão entre a atividade específica do estado final ( $E_l$ ) para uma modelagem de inativação com uma única etapa e a atividade inicial ( $E$ )
$k_d$	Constante cinética de desativação térmica
$t_{1/2}$	Tempo de meia-vida
$A^*$	Fator de frequência para a reação
$E_a$	Energia de ativação do processo de desativação térmica da enzima
$R^2$	Coefficiente de correlação
$t$	t de student
$p$	Nível de significância
$\sum(V-V_{\text{mod}})^2$	Somatória dos quadrados dos desvios das observações ( $V$ ) em relação ao modelo ( $V_{\text{mod}}$ )
$U$	Atividade enzimática (grama de glicose produzida por litro do meio por minuto por grama de suporte)

---

## RESUMO

A enzima  $\beta$ -galactosidase tem apresentado uso crescente na indústria de laticínios, visto que a mesma pode ser utilizada para produzir uma mistura isomolecular de glicose e galactose, além de possuir uma grande aplicação biotecnológica na produção de leite com baixo teor de lactose e na produção de galacto-oligossacarídeos a partir da lactose do soro, que está disponível em abundância como um subproduto da indústria de queijo. Tem-se ainda um grande interesse na estabilização da enzima imobilizada através de ligações covalentes multipontuais, visto que estas ligações podem aumentar a rigidez da enzima e, por consequência, aumentar a estabilidade frente a agentes inativantes. Neste trabalho foram estudadas a imobilização e estabilização de  $\beta$ -galactosidase em resina de troca iônica, com e sem *cross-linking*, utilizando glutaraldeído. O processo de imobilização consistiu na adsorção da enzima na resina de troca iônica Duolite A-568 e a estabilização do derivado enzimático foi realizado através da incubação do mesmo em tampão pH 9 a  $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  por 24h. Foi avaliada a influência da ordem das etapas de obtenção do biocatalisador imobilizado, bem como a influência do tampão utilizado e o efeito da presença do substrato no processo de obtenção do mesmo. A estabilidade do biocatalisador obtido foi avaliada em relação ao pH, à temperatura e à estocagem. A enzima imobilizada foi empacotada em um reator de leito fixo com reciclo operando em regime contínuo, com intuito de avaliar o processo hidrólise neste tipo de reator em função da razão de reciclo utilizada. Estudou-se a estabilidade operacional do biocatalisador durante 800 tempos de residência em reator contínuo. Os resultados indicaram que o método de obtenção de  $\beta$ -galactosidase de *Aspergillus oryzae* imobilizada em Duolite A568 que resultou na maior atividade catalítica foi a sequência dos processos de imobilização por adsorção, seguido da etapa de estabilização e finalmente submetida ao processo de ligação cruzada com glutaraldeído, promovendo um aumento de 44% da atividade enzimática, quando comparado com a atividade alcançada pelo biocatalisador obtido pelos processos de adsorção e *cross-linking*. O emprego do tampão borato reduziu a atividade em aproximadamente 70% quando comparado com a atividade do derivado obtido utilizando tampão fosfato. A adição da lactose como composto protetor do sítio ativo da enzima durante a imobilização não alterou o desempenho do biocatalisador, mostrando que o sítio ativo não está diretamente envolvido no processo de imobilização. O biocatalisador obtido pela combinação dos processos de adsorção, estabilização e ligação cruzada mostrou-se altamente estável em toda a faixa de pH estudada. Foi verificada uma forte dependência da enzima imobilizada em relação à temperatura. Para as temperaturas de 60, 57,5 e  $55^{\circ}\text{C}$  foi observado um patamar de estabilidade até os 30 minutos de incubação, a partir daí observa-se o processo de inativação térmica. Para a temperatura de  $55^{\circ}\text{C}$ , após 140 minutos o biocatalisador reteve 77% da atividade em relação à inicial. O modelo de desativação térmica de primeira ordem foi o que melhor se ajustou aos resultados experimentais para descrever a cinética de desativação térmica da enzima imobilizada. A energia de ativação do processo de desativação térmica de  $\beta$ -galactosidase de *Aspergillus oryzae* imobilizada foi 71,03 kcal/mol com tempos de meia vida de 5,5 horas a  $55^{\circ}\text{C}$ . A enzima imobilizada manteve sua atividade após 100 dias de armazenamento, em tampão acetato pH 4,5 a  $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$ . A razão de reciclo igual a 0,5 promoveu um incremento de aproximadamente 40% da conversão global quando comparado como a conversão por passe alcançada para a mesma condição de operação.

Palavras-chave:  $\beta$ -galactosidase, hidrólise de lactose, imobilização, estabilização, ligação covalente multipontual, Duolite A568, reator de leito fixo com reciclo.

## ABSTRACT

$\beta$ -galactosidase has presented increased use in the dairy industry, since it can be used to produce a isomolecular mixture of glucose and galactose and also has wide application in biotechnological production of milk with a low-lactose content and in production of galacto-oligosaccharides from whey lactose, which is abundantly available as a byproduct of the dairy industry. Having a great interest in the stabilization by multipoint covalent attachment of the enzyme immobilized, since these bonds can increase stiffness of the enzyme and, therefore, increase the stability against inactivating agents. In this work was studied the immobilization and stabilization of  $\beta$ -galactosidase using as carrier the ion exchange resin Duolite A568, with and without cross-linking using glutaraldehyde. The immobilization process was constituted by adsorption of the enzyme in Duolite A-568 and the stabilization procedure was performed by incubation of the biocatalyst in buffer pH 9 at  $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  for 24h. Was evaluated the influence of the steps's order to obtain the immobilized biocatalyst, as well as the influence of buffer used and the presence of the substrate in the process of obtaining biocatalyst. The stability of the biocatalyst obtained was evaluated with respect to pH, temperature and storage. The immobilized enzyme was packed in a fixed bed reactor with recycle operating in continuous, in order to assess the hydrolysis process this type of reactor as a function of recycle ratio used. Was studied the operational stability of the biocatalyst during 800 residence time in the reactor. The results indicated that the production's method to immobilize  $\beta$ -galactosidase from *Aspergillus oryzae* on Duolite A568 which improvement the catalytic activity was the result of the immobilization process by adsorption, followed by stabilization step, and finally subjected to the process of cross-linking with glutaraldehyde, promoting an increase of 44% enzyme activity compared with the activity achieved by the biocatalyst obtained by the processes of adsorption and cross-linking. The use of borate buffer reduced the activity by approximately 70% compared with the activity obtained by using phosphate buffer. The addition of lactose as a protective compound the active site of the enzyme during immobilization did not alter the performance of the biocatalyst, showing that the active site is not directly involved in the process of immobilization. The biocatalyst obtained by the combination of adsorption processes, stabilization, and crosslinking was highly stable over the entire pH range studied. It was observed a strong dependence of the immobilized enzyme in relation to temperature. At temperatures of 60, 57,5 and 55  $^{\circ}\text{C}$  there was a level of stability to the 30 minutes of incubation, from there one can observe the thermal inactivation process. At 55  $^{\circ}\text{C}$  after 140 minutes, the biocatalyst retained 77% its activity relative to baseline. The model of thermal deactivation of the first order was the best fit to the experimental results to describe the kinetics of thermal deactivation of the immobilized enzyme. The activation energy of thermal deactivation process of  $\beta$ -galactosidase from *Aspergillus oryzae* immobilized was 71,03 kcal/mol with half-lives of 5,5 hours at 55  $^{\circ}\text{C}$ . The immobilized enzyme retained its activity after 100 days of storage in acetate buffer pH 4.5 at  $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$ . The recycle ratio of 0,5 promoted an increase of approximately 40% of the overall conversion as compared to the conversion per pass achieved for the same operating condition.

Keywords:  $\beta$ -galactosidase, lactose hydrolysis, immobilization, stabilization, covalent multipoint, Duolite A568, fixed bed reactor with recycle.



---

## CAPÍTULO 1

### INTRODUÇÃO

---

A lactose é um dissacarídeo abundante no leite e no soro de leite, contudo a sua utilização em produtos lácteos é bastante limitada devido ao seu baixo poder adoçante, à sua baixa solubilidade, forte tendência a absorver odores e sabores, além de ser um açúcar higroscópico, o que causa o endurecimento dos derivados lácteos em pó. Outra restrição deve-se à intolerância a este dissacarídeo por grande parte da população mundial. A utilização de soro de leite tem sido limitada, sendo este normalmente descartado como um efluente de difícil degradação, em função de seu alto teor de lactose (CARMINATTI, 2001).

A produção mundial do leite de vaca em 2009 foi de 583 bilhões de litros, estando o Brasil na quinta posição no *ranking* dos maiores produtores mundiais, produzindo cerca 29 bilhões de litros/ano (EMBRAPA, 2011). Quanto à produção de queijos, o Brasil é o terceiro maior produtor mundial, com um total de aproximadamente 614.000 toneladas em 2009, gerando em torno de 5,5 milhões de toneladas de soro de leite (USDA, 2010).

Atualmente as indústrias de laticínios têm realizado investimentos tanto na renovação de produtos, como no lançamento de outros, tendo todos estes o leite como matéria-prima essencial. O leite é uma emulsão estável, complexa e nutritiva de gordura, proteínas, lactose, vitaminas e outros componentes que se encontram suspensos na água. Graças a ele e a seus derivados, obtém-se o aporte mais importante de cálcio para o organismo. (LEITE, 2009).

Entretanto, grande parte da população mundial não pode desfrutar dos benefícios proporcionados pelo leite devido a algum grau de rejeição aos produtos lácteos. A intolerância à lactose é definida como a incapacidade do organismo de hidrolisar a lactose no intestino delgado, isto acontece devido à ausência total ou à quantidade insuficiente da enzima lactase no aparelho digestivo, e por consequência a lactose não hidrolisada chega ao intestino grosso onde é fermentada por bactérias, produzindo ácido lático e gases, tais como, gás carbônico e hidrogênio. A intolerância à lactose é um problema comum, estimado em 20-25% na população brasileira de acordo com a Escola Paulista de Medicina, apesar de pouco diagnosticada (FREITAS, 2007).

A hidrólise da lactose é um processo promissor para a indústria de alimentos porque possibilita o desenvolvimento de novos produtos sem lactose em suas composições, aumentando assim a disponibilidade de nutrientes aos produtos lácteos e a nível mundial, a

atenuação por intolerância à lactose. Além disso, a hidrólise de lactose para a produção de monossacarídeos mais doces como a glicose e galactose permite sua utilização como edulcorantes nos xaropes gelados e outros produtos lácteos e também em alimentos não-lácteos (GÄNZLE, HAASE e GELLEN, 2008). Esta conversão é de considerável interesse, pois os produtos da hidrólise, em combinação, são mais doces, mais solúveis, diretamente fermentados e imediatamente absorvidos no intestino do lactente (MORRISSEY, 1985).

Enzimas adequadas a serem usadas na indústria de alimentos são produzidas por micro-organismos considerados seguros. Para a hidrólise de lactose em leite e produtos lácteos, enzimas de leveduras *Kluyveromyces lactis* ou *marxianus* e fungos filamentosos *Aspergillus niger* e *oryzae* são aceitas. As enzimas de fungos filamentosos (bolores e leveduras) podem ser usadas em soro ácido, já que seu pH ótimo situa-se na faixa de 2,5 a 5,0, mas são muito estáveis na faixa de pH entre 2,5 e 7,0, podendo ser utilizadas para leite e soro. As enzimas de leveduras podem ser usadas em leite e soro doce, já que seu pH ótimo situa-se entre 6,0 e 7,0 e as de bactéria apresentam pH de maior atividade na faixa de 6,5 a 7,5 (FREITAS, 2007).

Lactase, enzima responsável pela hidrólise de lactose pode ser encontrada em micro-organismos, bem como em tecidos animais. No entanto, o uso de ambos é limitado por considerações econômicas. Essa desvantagem pode ser superada através da utilização de enzimas imobilizadas, que são biocatalisadores mais estáveis e passíveis de reutilização, reduzindo assim os custos envolvidos (NERI et al., 2008).

Nos últimos anos, tem sido extensivamente estudada a imobilização enzimática para a sua utilização em aplicações alimentares. A  $\beta$ -galactosidase tem recebido um especial interesse, pois a mesma pode ser utilizada para produzir uma mistura isomolecular de glicose e galactose. A grande aplicação biotecnológica desta enzima está na produção de leite com baixo teor de lactose (e seus derivados produtos lácteos), para consumo por pessoas intolerantes. Além disso, também podem ser formados galacto-oligossacarídeos (MARTINS e BURKERT, 2009).

Outra aplicação importante de  $\beta$ -galactosidase é na hidrólise da lactose presente em resíduos da indústria de laticínios. Essa hidrólise, ao produzir glicose e galactose, faz com que o resíduo seja facilmente consumido por grande número de micro-organismos, pois há redução na produção de ácido láctico (LADERO, SANTOS e GARCIA-OCHOA, 2001).

Segundo Park et al. (2008) o potencial de uso industrial de uma  $\beta$ -galactosidase será tanto maior quanto maiores seus intervalos de temperatura e pH admissíveis. Assim, a

imobilização enzimática tem se apresentado alternativa viável para incremento da atividade e estabilidade do biocatalisador em relação à temperatura e pH.

Existem diversas técnicas de imobilização enzimática disponíveis, o processo por adsorção tem um potencial comercial mais elevado do que outros métodos, isto porque o processo de adsorção é mais simples, menos oneroso, mantém uma alta atividade catalítica, e mais importante, o suporte pode ser reutilizado várias vezes após a inativação da enzima imobilizada. A imobilização da enzima em resina de troca iônica é efetuado através de um procedimento simples, quando comparado com outros métodos de imobilização. Ela envolve basicamente interações iônicas e eletrostáticas (MARQUEZ et al., 2008).

Além dos inúmeros estudos sobre as técnicas e condições de imobilização disponíveis na literatura, há um grande interesse no processo de estabilização da enzima imobilizada através de ligações covalentes multipontuais, visto que estas ligações podem aumentar a rigidez da estrutura tridimensional da molécula de enzima e, por consequência, aumentar a estabilidade da enzima imobilizada frente a diferentes agentes inativantes, tais como, temperatura, pH, solventes orgânicos entre outros (MATEO et al., 2007).

Com base no exposto até o momento, tem-se como objetivo do presente trabalho avaliar o processo de hidrólise de lactose por  $\beta$ -galactosidase de *Aspergillus oryzae* imobilizada em Duolite A-568 por combinação dos métodos de adsorção física, ligação covalente multipontual e ligação cruzada. Como objetivos específicos têm-se:

- Estudar o processo de estabilização da enzima imobilizada através de ligações multipontuais;
- Avaliar a influência da composição do tampão pH 9 utilizado na etapa de estabilização;
- Analisar a efeito da presença do substrato durante a imobilização na retenção da atividade catalítica do biocatalisador obtido;
- Determinar a estabilidade do biocatalisador imobilizado em relação à temperatura, pH e estocagem;
- Avaliar hidrólise de lactose do permeado de soro de leite pela enzima  $\beta$ -galactosidase imobilizada em reator de leito fixo com reciclo;
- Estudar a estabilidade operacional do reator de leito fixo com reciclo utilizando permeado de soro de leite como substrato.

---

## CAPÍTULO 2

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

---

Neste capítulo é apresentada uma revisão da literatura sobre os temas pertinentes a este trabalho, dando ênfase para o leite, o soro de leite, hidrólise de lactose, que vem sendo motivo de muitos estudos. Foi realizada uma revisão dos trabalhos que utilizam enzimas imobilizadas, bem como reatores enzimáticos para hidrólise de lactose em leite e soro de leite. Também são apresentados fundamentos teóricos sobre os processos de estabilização por ligação multipontual, assim como os fatores que influenciam neste processo.

#### 2.1 Leite

Segundo a instrução normativa nº 51 publicada em 2002 pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), o leite é o produto oriundo da ordenha completa e ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas (BRASIL, 2002). Segundo Sgarbieri (1996) o leite, produto de secreção das glândulas mamárias, é um fluido viscoso constituído de uma fase líquida e partículas em suspensão, e em condições normais de temperatura ou de refrigeração, forma uma emulsão natural e estável.

A composição do leite é determinante para o estabelecimento da sua qualidade nutricional e adequação para processamento e consumo humano. A composição do leite de vaca varia de acordo com a espécie, a raça, a alimentação, o tempo de gestação e outros fatores. Assim, é difícil definir uma composição “normal” do leite. Entretanto, as relações entre seus diferentes constituintes são muito estáveis e podem ser utilizadas para indicar se houve qualquer adulteração na sua composição (BLOWEY, 1992). A composição aproximada do leite de vaca é apresentada na Tabela 2.1.

A água é o constituinte quantitativamente mais importante, no qual estão dissolvidos, dispersos ou emulsionados os demais componentes. A maior parte da água encontra-se como água livre, embora haja água ligada a outros componentes, como a proteínas, lactose e substâncias minerais. A gordura no leite ocorre como pequenos glóbulos contendo principalmente triacilgliceróis, envolvidos por uma membrana lipoproteica. O leite de vaca possui aproximadamente 440 ésteres de ácidos graxos e os principais são o ácido palmítico e

o ácido oléico. A gordura é o constituinte que mais sofre variações em razão de alimentação, raça, estação do ano e período de lactação (SILVA, 1997).

Tabela 2.1 - Composição média do leite de vaca.

<i>Constituinte</i>	<i>Teor (g/kg)</i>	<i>Variação (g/kg)</i>
Água	873	855-887
Lactose	46	38-53
Gordura	39	24-55
Proteínas	32,5	23-44
Substâncias minerais	6,5	5,3-8,0
Ácidos orgânicos	1,8	1,3-2,2
Outros	1,4	-

Fonte: Adaptado de Walstra e Jenness, 1984.

A lactose é o carboidrato mais importante do leite e é conhecida popularmente como “açúcar do leite”. Praticamente, o leite e o soro de leite são as fontes exclusivas de lactose, e a lactose é encontrada nas proporções (em termos de sólidos totais) de 40% a 50% no leite desnatado e 75% no soro de leite (SPREER, 1975; GÉKAS e LOPEZ-LEIVA, 1985; HOLSINGER, 1988; PORTO, 2001). A lactose confere ao leite um sabor ligeiramente doce e constitui fonte de carbono de micro-organismos, sobretudo leveduras que crescem no leite, visando a produção de biomassa, etanol, ácidos orgânicos, enzimas e extrato de levedura (WALSTRA e JENNESS, 1984).

As proteínas do leite são subdivididas em caseína (80%), sendo a principal proteína do leite, é uma substância coloidal complexa, associada ao cálcio e ao fósforo, podendo ser coagulada por ação de ácidos, coalho e/ou álcool; e proteínas do soro (20%), que se encontram completamente dissolvidas na água do leite, são formadas pelas frações: albumina do soro,  $\alpha$ -lactoalbumina,  $\beta$ -lactoglobulina, imunoglobulinas e protease-peptonas (TRONCO, 2003).

Diversas enzimas podem ser encontradas no leite, tais como lipases, proteinases, óxido-redutases, fosfatases, catalase e peroxidase. O desenvolvimento, intencional ou não, de micro-organismos no leite contribui para o complexo enzimático. A atividade dessas enzimas é influenciada pelas condições do meio (temperatura, pH, acesso ao substrato), sendo alteráveis pelo processamento tecnológico. O leite contém teores consideráveis de cloro,

fósforo, potássio, sódio, cálcio e magnésio e baixos teores de ferro, alumínio, bromo, zinco e manganês, formando sais orgânicos e inorgânicos. A associação entre os sais e as proteínas do leite é um fator determinante para a estabilidade das caseínas frente a diferentes agentes desnaturantes (SILVA, 1997). O leite contém ainda diversas vitaminas, classificadas como lipossolúveis, A, D, E, e K e hidrossolúveis, B e C (TRONCO, 2003).

O sabor levemente adocicado do leite fresco deve-se principalmente à lactose, contudo todos os elementos do leite contribuem de forma direta ou indireta na sensação de sabor. O leite possui uma cor definida como branco-amarelada e opaca, que se deve principalmente à dispersão da luz pelas micelas de fosfocaseinato de cálcio. Os glóbulos de gordura também dispersam a luz, mas contribuem muito pouco para a cor branca do leite. O caroteno e a riboflavina contribuem para a cor amarelada (BELITZ, GROSH e SCHIEBERLE, 2009).

As principais propriedades físico-químicas do leite são: pH, que varia de 6,4 a 6,9; acidez, cujos valores estão entre 0,14 a 0,18 g de ácido láctico em 100 mL; densidade relativa, que varia de 1,028 a 1,034 g/mL e índice crioscópico máximo de -0,512°C, sendo esta característica a mais constante do leite e aquela mais utilizada pelos laticínios para detecção de adulteração do mesmo com água. Essas propriedades auxiliam na caracterização do leite e determinação da sua qualidade (BRASIL, 2002).

O leite bovino é comercializado em sua forma líquida, integral ou desengordurado, e pasteurizado ou esterilizado. Essas mesmas formas são também comercializadas desidratadas, leite em pó. Além disso, a indústria criou nichos de mercado dentro do segmento, com produtos para cada tipo de necessidade específica, onde é possível encontrar leite enriquecido com ferro e cálcio, com 0% de gordura, isento de lactose, com adição de fibras, com adição de melatonina, ficando a critério do consumidor escolher qual o melhor produto para a sua necessidade.

## **2.2 Soro lácteo**

Há cerca de 3000 anos o soro de leite foi descoberto quando estômagos de bezerros foram usados para armazenar e transportar leite, resultando na transformação do leite em coalhada por meio da ação natural da enzima quimosina localizada no estômago dos vitelos (SMITHERS, 2008).

As indústrias de produtos lácteos geram três resíduos na forma líquida: o soro, subproduto da indústria de queijo e caseína, o leitelho, resultante da produção de manteiga e o leite ácido. O soro é o de maior importância devido ao volume produzido, ao amplo espectro de possibilidades de reutilização visto seu potencial nutritivo e, principalmente seu elevado poder poluente (ZIMMER, 2006).

O soro lácteo pode ser definido como a porção aquosa que se separa do coágulo durante a fabricação convencional do queijo ou manufatura da caseína. É um líquido quase opaco, de cor amarelo-esverdeado, consiste em aproximadamente 85 a 90% do volume do leite utilizado na produção de queijo e retém cerca de 55% dos nutrientes do leite. A composição natural do soro é rica em lactose (4,0 a 5,0%) e proteínas (0,7 a 0,9%), e possui pequenas quantidades de ácidos orgânicos, lipídeos e sais minerais (MIZUBUTI, 1994).

Do ponto de vista industrial, o soro de leite pode ser classificado em dois tipos de acordo com a forma de remoção da caseína. Se a remoção da caseína presente no soro é feita pela adição de ácido (pH 4,6) o soro é denominado soro ácido, já se a caseína for removida pela ação da renina tem-se o soro doce, que contém, em geral, maior quantidade de pequenos peptídeos e aminoácidos livres, que são resultantes da ação da renina sobre as caseínas (PINTO, 2008). Segundo Sgarbieri (2004) o soro de leite também pode ser obtido pelo processo de separação física das micelas de caseína por micro-filtração, obtendo-se um concentrado de micelas e as proteínas do soro, na forma de concentrado ou isolado protéico.

A composição química do soro depende da composição química do leite que varia de acordo com a alimentação, reprodução, diferença individual do animal e do clima (JOHANSEN, VEGARUD e SKEIE, 2002). Além disso, a composição e o tipo de soro produzido na indústria leiteira variam em função dos processos tecnológicos empregados, do leite utilizado e do tipo de queijo fabricado (TEIXEIRA; FONSECA, 2008). Na Tabela 2.2 é apresentada uma comparação entre as composições do leite integral, leite desnatado, soro doce e soro ácido.

Tabela 2.2 – Composição do leite integral, leite desnatado e do soro de leite doce e ácido.

<i>Componente</i> (%)	<i>Leite Integral</i>	<i>Leite Desnatado</i>	<i>Soro Doce</i> (pH 6,7)	<i>Soro Ácido</i> (pH 4,6)
Umidade	84,7	90,4	93,7	93,5
Lactose	4,8	5,1	4,9	4,9
Gordura	3,5	0,1	0,5	0,04
Proteína	3,5	3,6	0,8	0,7
Cinzas	0,7	0,7	0,5	0,8

Fonte: USDEC, 2009

A produção de soro de leite aumentou acentuadamente nas últimas décadas, juntamente com a produção de queijo (DERMIKI et al., 2008), sendo estimada na ordem dos 160 milhões de toneladas por ano (MAGALHÃES et al., 2010). Em média, em todo o mundo, o volume de soro de leite está crescendo a uma taxa quase a mesma que os volumes de leite, cerca de 42% ao ano (SMITHERS, 2008).

O soro lácteo apresenta potencial poluidor, aproximadamente, 100 vezes maior que o do esgoto doméstico (PORTO, SANTOS e MIRANDA, 2005). E quando o soro é despejado junto com os demais resíduos líquidos das indústrias de laticínios pode significar a duplicação do sistema de tratamento, pois exibe uma alta Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO), apresentando valores de 30-50 g L<sup>-1</sup> e uma Demanda Química de Oxigênio (DQO) da ordem de 60-80 g L<sup>-1</sup>. A grande responsável pela alta DBO e DQO é a lactose. A estabilização por métodos convencionais para o tratamento biológico do soro é dificultado pelo fato deste apresentar alta concentração de matéria orgânica e deficiência de nitrogênio (GIROTO; PAWLOWSKY, 2001).

Por muito tempo o soro foi considerado um problema no que se refere a resíduo industrial ou produto com valor comercial residual, utilizado apenas como alimentação animal. Contudo, nas três últimas décadas, foi percebido o potencial econômico da utilização do soro como fonte de produtos de valor agregado, visto que contém metade dos sólidos do leite e alto valor nutritivo (TREMARIN, 2007).

Recentemente, a procura de soro de leite começou a aumentar devido aos benefícios que as proteínas de alta qualidade encontrada no mesmo oferecem às crianças, adultos e idosos. O aumento de aplicações farmacêuticas das frações de proteínas para o controle da pressão arterial e para indução do sono pode aumentar ainda mais o mercado (KOSSEVA et



al., 2009). Os produtos de soro apresentam a importante vantagem de possuírem propriedades funcionais, além de ser uma fonte concentrada de nutrientes lácteos, sobretudo proteínas de elevado valor nutricional e cálcio (THAMER; PENNA, 2006).

Em relação aos aspectos nutricionais e fisiológicos, as proteínas do soro do leite podem ser usadas em aplicações nutricionais, como fórmulas enterais e infantis; na forma de proteínas nativas ou pré-digeridas contribui com o baixo valor calórico dos alimentos; e na substituição de gordura, ou na formulação de alimentos e bebidas saudáveis (CAPITANI et al., 2005).

De acordo com Pacheco et al. (2005) as proteínas do soro apresentam algumas vantagens em relação à caseínas. Diferenças fundamentais no metabolismo e na ação fisiológica das caseínas e das proteínas de soro de leite baseiam-se na propriedade das proteínas do soro não sofrerem alterações conformacionais pelos ácidos estomacais. Ao atingirem o intestino delgado são rapidamente digeridas e seus aminoácidos absorvidos, elevando rapidamente a concentração aminoacídica do plasma e estimulando a síntese de proteínas nos tecidos (SGARBIERI, 2004).

Tem-se observado que, enquanto nos países desenvolvidos cerca de 95% do total do soro é utilizado na indústria de alimentos, no Brasil apenas 50% da produção é utilizada (CASTRO et al., 2009). A maior parte do soro pode ser utilizada diretamente sob a forma líquida, desde o uso como matéria-prima na elaboração de ricota e bebidas lácteas, até a utilização de modernas tecnologias para obtenção de produtos específicos e/ou novos produtos a serem formulados (ALMEIDA et al., 2004; PORTO, SANTOS E MIRANDA, 2005; TEIXEIRA; FONSECA, 2008).

As bebidas contendo soro lácteo são, hoje, uma realidade no mercado brasileiro, sendo processadas de diversas formas como UHT (*ultra-high temperature*), pasteurizadas, fermentadas semelhantes ao iogurte, *soft-drinks*, carbonatadas e em diversos sabores, como morango, chocolate, frutas cítricas, etc., com um mercado consumidor promissor. Dessa maneira, é crescente o número de pesquisas com bebidas contendo soro de leite (ALMEIDA, BONASSI E ROÇA, 2001; THAMER; PENNA, 2006; ALMEIDA, TAMIME e OLIVEIRA, 2009; PFLANZER et al., 2010).

Estudos recentes têm demonstrado a viabilidade da utilização do soro líquido em concentrações que variam de 30% a 70% na produção de bebidas lácteas, com características próximas ao iogurte natural em relação à coloração e ao aroma. A viscosidade da bebida pode

variar de relativamente baixa, semelhante à de uma mistura leite e suco de frutas, até a viscosidade dos tradicionais iogurtes para beber (PENNA, ALMEIDA e OLIVEIRA, 2009).

O fracionamento do soro em lactose e proteínas permite a utilização dos constituintes de maior importância comercial presentes no soro de leite. A lactose tem várias propriedades funcionais úteis que tornam sua aplicação desejável em indústrias alimentícias e farmacêuticas (BALDASSO, 2008; MATHUR et al., 1980).

O permeado de soro de leite pode ser obtido através da remoção de proteína do soro de leite, por membranas de ultrafiltração, seguido de concentração em evaporadores tubulares e posterior desidratação. O permeado pode ser utilizado em diversos produtos, tanto para alimentação humana quanto para alimentação animal, podendo ser usado em: produtos cárneos, lácteos, panificação, confeitaria, *snacks*, salgadinhos, sorvetes, suplemento alimentar, ração animal, fármacos, entre outros (<http://sooro.com.br/>).

O soro na forma de concentrados protéicos vem sendo aplicado pela indústria de alimentos na confecção de produtos dietéticos, nos quais age como substituinte da gordura, em produtos de panificação, confeitaria, cárneos, sopas, molhos para salada, alimentos infantis, bebidas para atletas, dietas enterais e produtos lácteos (ANTUNES, CAZETTO e BOLINI, 2004). Algumas possibilidades para o aproveitamento de soros lácteos (OLIVEIRA, 2000):

- Bebidas carbonatadas e fermentadas
- Bebidas energéticas
- Produção de biscoitos, alimentos lácteos em pó
- Precipitados de albuminas e globulinas como aditivos alimentares
- Preparados de albuminas utilizados como suplemento de valor nutritivo de alguns elementos
- Preparados cosméticos e farmacêuticos
- Fabricação de álcool
- Produção de lactose
- Fabricação de queijo de soro, Ziger, Urda, Ricotta, etc
- Fabricação de ácido láctico para a indústria farmacêutica ou alimentícia
- Meio de fermentação para a fabricação de antibióticos, combustíveis (metano)
- Biomassa para a produção de alimentos

Com o contínuo desenvolvimento de tecnologia e crescente responsabilidade ambiental por parte das indústrias, a imagem do soro está mudando rapidamente de efluente para uma fonte valiosa de nutrientes, e possibilidade de desenvolvimento de produtos de valor agregado. A hidrólise da lactose presente no soro lácteo mostra-se como uma alternativa para produção de derivados lácteos com baixo teor de lactose, além da possibilidade de produção de galactooligossacarídeos.

### 2.3 Lactose

A lactose ( $C_{12}H_{22}O_{11}$ ) é um pó branco, cristalino, solúvel em água, insolúvel em álcool e éter, que se encontra principalmente no leite, e por isso também se denomina açúcar de leite. Apresenta baixa solubilidade, fraco poder adoçante (Tabela 2.3) e incapacidade de ser fermentado por diversos micro-organismos (BRITO, 2007).

Tabela 2.3 – Poder adoçante relativo e solubilidade de alguns dissacarídeos e monossacarídeos

<i>Açúcar</i>	<i>Poder adoçante relativo</i>	<i>Solubilidade (g lactose/100 g água)</i>		
		10 °C	30 °C	50 °C
Sacarose	100	66	69	73
Lactose	16	13	20	30
D-galactose	32	28	36	47
D-glicose	74	40	54	70
D-frutose	173	-	82	87

Fonte: ZADOW, 1984

Formado de galactose e glicose, a lactose que no leite cru é responsável por 40% do total de sólidos, e nos leites desengordurados corresponde a 54% dos sólidos totais. No soro a lactose é o composto sólido em maior quantidade em torno de 70% em base seca (MATTILA-SANDHOLM; SAARELA, 2003).

A lactose é um dissacarídeo constituído por um radical  $\beta$ -D-galactose e um radical  $\alpha$ -D-glicose unidos por ligação glicosídica  $\beta$ -1,4. Seu nome químico é 4-O- $\beta$ -D-galactopiranosil- $\alpha$ -D-glucopiranosose e pode ser identificado como 4-( $\beta$ -D-galacto-sido)-D-glucose (Figura 2.1). A lactose é considerada um açúcar redutor, porque o grupo no carbono

anomérico da porção glicose não está envolvido na ligação glicosídica, portanto, ela está livre para reagir com agentes oxidantes (CAMPBELL, 2005).

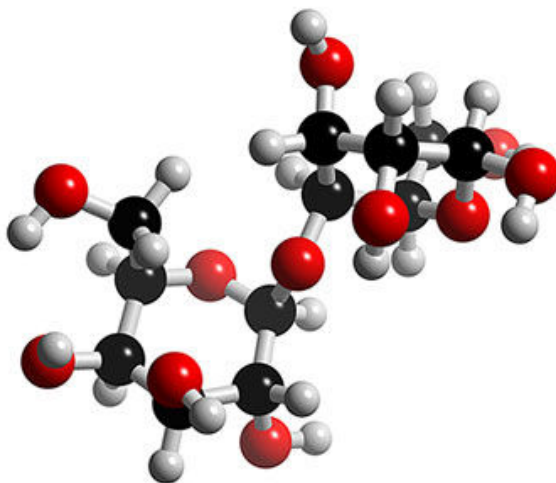


Figura 2.1 – Molécula de lactose. (Fonte: [www.3dchem.com](http://www.3dchem.com))

A lactose apresenta-se em duas formas anoméricas,  $\alpha$  e  $\beta$ , diferindo somente nas posições relativas do hidrogênio e do grupo hidroxila no átomo de carbono, contudo a forma  $\alpha$  é frequentemente mais usada em aplicações industriais. A estrutura da  $\alpha$ -lactose e da  $\beta$ -lactose são apresentadas respectivamente na Figura 2.2.

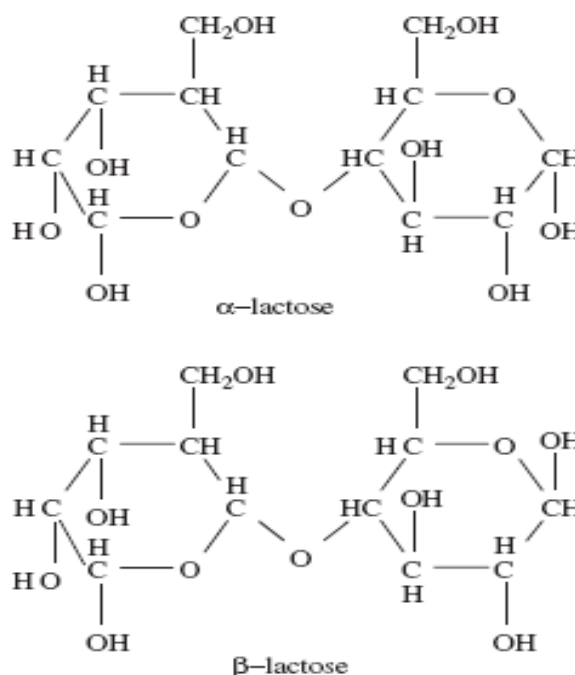


Figura 2.2 – Estrutura molecular de  $\alpha$ -lactose e  $\beta$ -lactose (GÄNZLE et al., 2008)

Conforme Brito (2007), a lactose, em solução aquosa, consiste de 61,5% de anômero  $\beta$  e 38,5% de  $\alpha$ . O equilíbrio entre ambas as formas é estabilizado por mutarrotação, ou seja, pode ocorrer uma mudança na posição da hidroxila e do hidrogênio do grupo redutor da lactose, fazendo com que a forma  $\alpha$  se transforme em  $\beta$  e vice-versa. Essa mudança na rotação e a transformação de uma forma na outra persiste até que haja o equilíbrio mutarrotacional. As formas  $\beta$  e  $\alpha$  possuem características físicas distintas, como por exemplo, a solubilidade. A forma  $\alpha$  possui “solubilidade verdadeira”, a 15°C, de 7g/100g de água, enquanto que a forma  $\beta$ , sob as mesmas condições, apresenta solubilidade de 50g/100g de água (a solubilidade média da lactose, a 20°C, é de 20g/100g de água). Por isso, o fenômeno da mutarrotação é muito importante no processo de cristalização (NICKERSON, 1974).

Segundo Kiska et al. (1973), o processo de cristalização da lactose é condicionado a vários fatores, como a velocidade de mutarrotação das formas  $\alpha$  e  $\beta$ , o grau de saturação da solução, viscosidade, pH e a temperatura dos produtos lácteos. A formação de cristais de dimensões superiores a 10 micrômetros contribui para o aparecimento de uma estrutura arenosa nos produtos lácteos, causando sua depreciação.

Muitas aplicações podem ser propostas para a utilização da lactose, principalmente devido às suas características físico-químicas em relação a outros açúcares. Na indústria de alimentos pode ser utilizada na preparação de condimentos, de produtos para confeitarias,

padarias e para uso como xarope. A lactose pode ser ainda utilizada em grau farmacêutico, para isso a lactose em pó é concentrada e parcialmente acidificada, além de ser submetida a diversos tratamentos subsequentes (BRANDÃO, 1994).

É possível utilizar a lactose presente no soro de leite como substrato de fermentação a fim de se obter diversos produtos de aplicação industrial, já que constitui uma fonte de energia considerável para os micro-organismos (ORDÓÑEZ, 2005).

A lactose, um dos principais constituintes do soro de leite, pode ser transformada enzimaticamente a galacto-oligossacarídeos (GOS), que são facilmente utilizados por bifidobactérias, contribuindo assim para um melhor funcionamento do trato digestivo (HA; ZEMEL, 2003). Os benefícios da ingestão de GOS são aumento da população de bifidobactérias no cólon e, por efeito antagônico, supressão da atividade de bactérias putrefativas, reduzindo a formação de metabólitos tóxicos e produção de ácidos graxos de cadeia curta (SANTOS, SIMIQUELI e PASTORE, 2009).

A remoção da lactose dos derivados lácteos (leite, soro de leite) tem sido extensamente estudada devido aos problemas nutricionais (intolerância à lactose) e aos interesses tecnológicos (solubilidade, poder adoçante e funcionalidade) envolvidos no desenvolvimento de produtos baseados na indústria de laticínios.

## 2.4 Intolerância a lactose

A intolerância à lactose é uma afecção da mucosa intestinal que a incapacita a digerir a lactose devido à deficiência de uma enzima denominada lactase ( $\beta$ -D-Galactosidase). Acredita-se que esta condição afeta mais de 75% da população mundial, dos quais aproximadamente 5% ocorrem no norte da Europa e mais de 90% em alguns países da Ásia e da África. No Brasil 20 a 25% da população sofre de intolerância à lactose. Estudos mostram prevalências de 8% a 45% nas regiões sudeste e sul, com aumento significativo na região nordeste, 75%. Estes dados são explicados pelo fato de a raça negra ter normalmente menor produção de lactase, com a idade, que a branca (SPARVOLI, 1989; PRETTO *et al.*, 2002; PEREIRA FILHO e FURLAN, 2004; FRYE, 2002).

Existem três situações possíveis em relação à lactose, a saber, a intolerância, a alergia e a sensibilidade, que são constantemente confundidas, por isto é de suma importância entender a clara diferença entre elas. A intolerância é uma reação adversa que envolve a digestão ou o metabolismo, causando inchaço, flatulência, dores abdominais, diarreia, porém

não envolve o sistema imunitário. A alergia consiste numa resposta do sistema imunitário a componentes alimentares, geralmente proteínas; é quase que exclusivamente limitada aos recém-nascidos. A sensibilidade evidencia-se como uma resposta anormal, por vezes com uma reação semelhante a da alergia (INSUMOS, 2010).

A deficiência de  $\beta$ -galactosidase é geralmente diagnosticada com base em história de sintomas gastrointestinais, que ocorrem após ingestão do leite, por teste para níveis anormais de hidrogênio na respiração (a fermentação da lactose digerida resulta na produção de hidrogênio), ou medição da atividade dissacaridásica da mucosa intestinal por intubação intestinal (LOMER, PARKES E SANDERSON, 2008).

Existem três classes de intolerância à lactose, decorrentes de diferentes processos: deficiência congênita da enzima; diminuição enzimática secundária oriunda de doenças intestinais; deficiência primária ou ontogenética (FARIAS; FAGUNDES NETO, 2004; LONGO, 2006):

- *Deficiência congênita de lactase:* é um defeito genético muito raro e manifesta-se nos recém-nascidos, logo após a primeira ou segunda ingestão de leite, sendo uma condição permanente. Existem apenas algumas dúzias de casos levantados no mundo todo.
- *Diminuição enzimática secundária:* é a mais comum e pode ocorrer em consequência de doenças que causam algum tipo de dano à mucosa intestinal ou após as cirurgias no aparelho digestivo, ou também em prematuros em que uma imaturidade enzimática associada a um processo infeccioso ocasiona uma deficiência temporária de lactase, sendo eliminada à medida que houver recuperação dessas células, mas pode levar à intolerância.
- *Deficiência primária ou ontogenética:* é o tipo mais comum na população, consiste em uma tendência natural do organismo em diminuir a produção de lactase com o avançar da idade.

Quanto ao tratamento, no caso de intolerância congênita à lactose, existe a necessidade de seguimento de dieta isenta de lactose. Se a deficiência enzimática for adquirida, essa forma de se alimentar não é permanente, podendo-se retornar à dieta habitual após a resolução do problema. No caso de deficiência ontogênica, como existe apenas uma diminuição de atividade enzimática, não há a necessidade de excluir a lactose completamente da dieta, bastando haver uma redução da quantidade de leite e derivados de acordo com a tolerância individual. Uma das grandes preocupações com a diminuição da lactose na

alimentação é a garantia do fornecimento de quantidade apropriada de proteínas, cálcio, riboflavina e vitamina D, que tem no leite e em seus derivados sua maior fonte (UGGIONI; FAGUNDES, 2006).

Segundo During *et al.* (1998), mais de 50% da população mundial apresenta condição de deficiência de lactase, sendo esta uma das mais comuns desordens genéticas. No entanto, a lactose age como um promotor na absorção e na retenção de cálcio no intestino e na absorção de magnésio e manganês (MANAN, KARIM e KIT, 1999). Também prolonga a ação da vitamina D, em caso de redução da radiação solar, e ajuda na prevenção do raquitismo e da osteomalácia (KOCIÁN, 1988). Segundo Moriwaki e Matioli (2000), a redução ou eliminação do leite e seus derivados da dieta de crianças intolerantes à lactose pode comprometer a absorção de proteína e riboflavina, além do cálcio. Portanto é recomendada a adição de cálcio nos produtos lácteos sem lactose ou com quantidade de lactose reduzida porque a absorção desse mineral no intestino é baixa quando não se tem a presença de lactose (KOCIÁN, 1988).

De acordo com O'connell e Walsh (2006) nenhum dos medicamentos disponíveis no mercado possui os critérios adequados para suplementação da hidrólise de lactose no trato digestivo humano com lactase como medicamento, pois são instáveis no pH estomacal e não ajudam a todos os indivíduos da mesma forma. Isto justifica a importância da hidrólise antes da ingestão do alimento.

Um estudo realizado com chineses, tidos como intolerantes à lactose, mostrou que uma introdução gradual de leite pode ser aceitável e o leite é melhor tolerado quando consumido junto a uma refeição. Mesmo os intolerantes à lactose podem tolerar uma porção de leite em uma refeição sem apresentarem desconfortos gastrintestinais (TORRES, 2004).

Aproximadamente 70% dos descendentes de africanos, 95% dos asiáticos e 53% dos hispânicos são intolerantes à lactose, comparados com apenas 10% a 15% dos americanos brancos e descendentes de norte-europeus (SHAH FEDORAK e JELEN, 1992; TORRES, 2004). Estudo sobre auto-avaliação à intolerância à lactose envolvendo aproximadamente 3.500 pessoas entre 19 e 70 anos de idade, provenientes de 03 grupos étnicos-raciais, (brancos, africanos americanos e hispano-americanos) apontam que 12,3% dos entrevistados se auto-avaliam intolerantes à lactose (NICKLAS *et al.*, 2011).

A hidrólise da lactose é uma das principais tecnologias aplicadas para a produção de produtos lácteos com baixa lactose, ainda existem outras técnicas para remoção da lactose do leite. O método preferencialmente utilizado hoje é a hidrólise enzimática pela adição de  $\beta$ -



galactosidase. A lactose pode ser hidrolisada antes do tratamento térmico, ou após, se a enzima for adicionada antes do envase do produto. Ao ser adicionada ao leite, a enzima  $\beta$ -galactosidase efetua a quebra da molécula de lactose tal como a lactase intestinal, o que dá àqueles que possuem a deficiência desta enzima a possibilidade de usufruir dos outros nutrientes presentes no leite, como a proteína, o cálcio e a vitamina A, evitando os inconvenientes e desconfortos causados pela má absorção da lactose (TANRISEVEN e DOGAN, 2002).

## 2.5 Hidrólise da lactose

A hidrólise de lactose possibilita o desenvolvimento de novos produtos para consumidores intolerantes a esse carboidrato, além de oferecer diversas vantagens tecnológicas, tais como, a diminuição da cristalização da lactose em produtos lácteos e o aumento do poder adoçante, vantagens estas que apontam que a hidrólise de lactose é um processo industrial promissor (OBÓN et al., 2000; FISCHER, 2010).

Em princípio, a reação de hidrólise da lactose forma uma mistura isomolecular de glicose e galactose. Contudo, dependendo das condições, a mistura isomolecular não é alcançada na prática, pois a galactose pode polimerizar-se ou se unir à lactose para formar oligossacarídeos conforme mecanismo apresentado na Figura 2.3 (GÉKAS e LÓPEZ-LEIVA, 1985; MAHONEY, 1998).

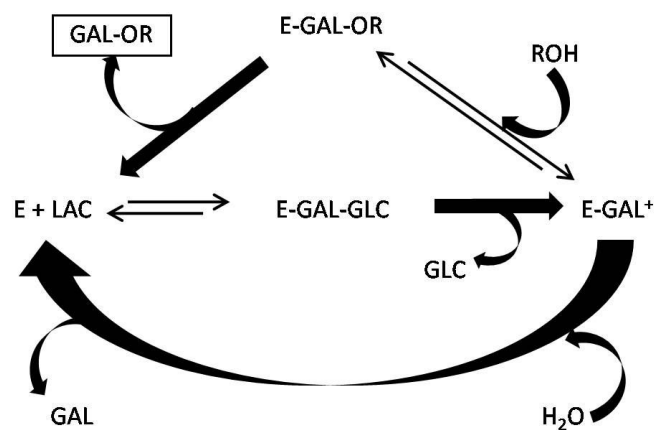


Figura 2.3 – Mecanismo proposto para formação de oligossacarídeos (GAL: Galactose, E: Enzima, LAC: Lactose, GLC: Glicose, ROH: Radical hidroxila) (MAHONEY, 1998).

Existem dois métodos utilizados para a hidrólise da lactose, o método ácido e o método enzimático (Figura 2.4):

- Método ácido: A reação é muito rápida, mas envolve soluções diluídas de ácido fortes, como sulfúrico e clorídrico, e condições operacionais severas de pH (1,0-2,0) e temperatura (100-150°C), e por isto tem sua aplicação comercial na indústria alimentícia restrita, pois acarreta alterações no sabor e cor dos alimentos, além de causar desnaturação das proteínas do leite.
- Método enzimático: pode ser aplicado no leite ou no soro sem um tratamento prévio. A hidrólise é catalisada pela  $\beta$ -galactosidase e se processa em condições amenas de pH e temperatura (30 a 40°C), o que reduz não só a possibilidade de alteração dos compostos sensíveis ao calor, mas também as necessidades energéticas, os efeitos de corrosão do meio sobre equipamentos e a formação de subprodutos indesejáveis. Os produtos obtidos por este processo preservam as suas propriedades, aumentando seu poder adoçante relativo (GEKAS e LOPEZ-LEIVA, 1985; BAILEY e OLLIS, 1986; LADERO et al., 2000).

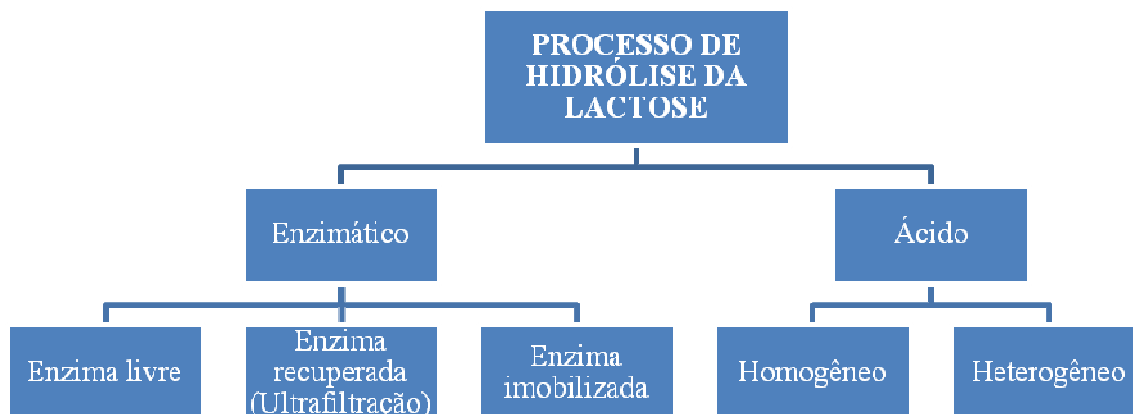


Figura 2.4 – Processos de hidrólise da lactose (HOBMAN, 1984)

A hidrólise da lactose em leite resulta em economia de sacarose na preparação de produtos açucarados, pois diversos produtos fabricados a partir de leite com baixo teor de lactose requerem pouca ou nenhuma adição de sacarose, visto que a doçura da lactose hidrolisada é de aproximadamente 70% da doçura da sacarose. O soro de leite hidrolisado é adequado para adoçar produtos lácteos, tais como iogurtes de frutas, sorvetes e bebidas à base de soro. Os xaropes são utilizados em produtos alimentícios processados, como doces e produtos de panificação. Uma das razões para usar a lactose hidrolisada, além de aumentar a

doçura e a solubilidade, é a formação de cores e substâncias aromáticas devido à reação de Maillard (INSUMOS, 2010).

A hidrólise enzimática é um dos métodos mais interessantes para redução do teor de lactose no leite e nos seus derivados. Este processo é conhecido e utilizado em escala industrial. Nele a enzima  $\beta$ -galactosidase, na forma livre ou imobilizada, hidrolisa a ligação  $\beta$  (1-4) da molécula de lactose, dando origem aos seus monômeros, glicose e galactose.

Inúmeros trabalhos sobre hidrólise de lactose têm sido apresentados na literatura:

Haider e Husain (2009) comparam a hidrólise da lactose de leite/soro utilizando  $\beta$ -galactosidase encapsulada em alginato de cálcio em reator batelada agitado e reator leito fixo. Neste trabalho, 86% e 77% da lactose presente no soro e no leite, respectivamente, foram hidrolisadas em processo batelada após três horas de reação.

Elnashar e Yassin (2009) imobilizaram covalentemente a  $\beta$ -galactosidase obtida de *Aspergillus oryzae* em polímeros termicamente estáveis e obtiveram 70 % de conversão de lactose após sete horas de operação.

Ansari e Husain (2012) estudaram a hidrólise de lactose do leite/soro em processos contínuo e batelada utilizando  $\beta$ -galactosidase de *Aspergillus oryzae* imobilizada em A-Celite 545. A hidrólise da lactose em reator contínuo utilizando  $\beta$ -galactosidase reticulada foi de 92% e 81% nas vazões de 20 mL/h e 30 mL/h após um mês de operação, respectivamente.

Guidini et al. (2011) estudaram a cinética de hidrólise de lactose por  $\beta$ -galactosidase de *Aspergillus oryzae* imobilizada em resina de troca iônica Duolite A 568. O modelo cinético que melhor se ajustou aos resultados experimentais foi o modelo de Michaelis-Menten com inibição competitiva pela galactose.

## 2.6 Enzimas

Enzimas são catalisadores biológicos, consistindo de proteínas globulares, de estrutura terciária ou quaternária, termolábeis e não dialisáveis, que participam de muitas reações químicas que ocorrem no dia-a-dia, aumentando a velocidade das reações no organismo, sem serem, elas próprias, alteradas neste processo. Ao contrário das catálises químicas ordinárias, enzimas possuem a habilidade de catalisar uma reação sob condições brandas em soluções aquosas neutras sob temperaturas e pressões normais, e com alto grau de especificidade (CHIBATA, 1978; HARGER et al., 1982; CHAMPE e HARVEY, 1989; SENS, 2009).

Elas são formadas por uma sequência de resíduos de aminoácidos conectados uns aos outros através de ligações peptídicas, também conhecidas como amídicas. Apesar de grande massa molecular, essas proteínas são hidrossolúveis, devido ao fato de que cada unidade monomérica constituinte da estrutura desse polímero tem grupamentos polares – COOH, OH, NH<sub>2</sub>, SH, CONH<sub>2</sub> – fazendo com que seja possível a solvatação desses grupamentos ao longo de toda a extensão da molécula. Apesar da estrutura de uma proteína estar representada de forma linear na Figura 2.5, a liberdade de rotação das ligações carbono-carbono e carbono-heteroátomo, bem como a possibilidade de interações intra-moleculares – principalmente via ligações de hidrogênio – associada às restrições estéricas dos grupamentos R, faz com que as enzimas assumam arranjos tridimensionais lhes garantindo um formato específico (REIS, 2009).

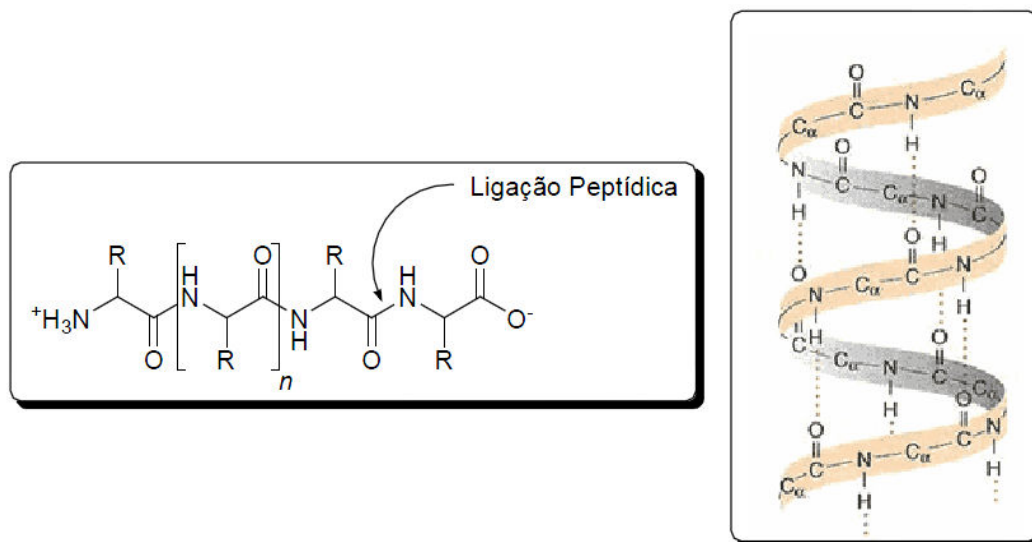


Figura 2.5 – Representação da proteína; a esquerda estrutura linear e a direita estrutura em hélice.

As enzimas são classificadas de acordo com o tipo de transformação que são capazes de catalisar. De acordo com esse critério, a União Internacional de Bioquímica as dividiu em seis classes, conforme apresentado na Tabela 2.4.

Tabela 2.4 – Classificação das enzimas

<i>Classe</i>	<i>Tipo de Reação catalisada</i>	<i>Exemplos</i>
1. Oxidorredutases	Reações de redução e oxidação por transferência de hidrogênio, oxigênio e/ou elétrons entre moléculas	Desidrogenases, oxidases, oxigenases, peroxidases
2. Transferases	Transferência de determinados grupos orgânicos, tais como amino, acetil, fosforil, glicosil, de determinado doador a uma acceptor	Aminoácido transaminases
3. Hidrolases	Clivagem hidrolítica de ligações C-O, C-N, C-C e outras ligações	Lipases, acilases, nitrilases, amidases, proteases
4. Liasas	Clivagem por eliminação (formação de dupla ligação) ou adição a duplas ligações	Aldolases, oxinitrilases, hidroxinitrila liases
5. Isomerases	Catalisam reações de isomerização e racemização	Racemases, glicose isomerase
6. Ligases	Catalisam a junção covalente de duas moléculas à custa de ATP	Sintetases, glicina ligase

Fonte: BLANCH e CLARK, 1997

Mesmo existindo seis diferentes classes de enzimas, as hidrolases protagonizam o cenário da síntese orgânica, representando cerca de 60% das enzimas utilizadas; as oxidorredutases aparecem em segundo lugar, representado 25%. Aproximadamente 3.200 enzimas já foram catalogadas pela União Internacional de Bioquímica, porém estima-se que exista na natureza um número em torno de 25.000, sendo que 90% desta reserva permanece sem ser isolada, catalogada e consequentemente utilizada. Somente uma pequena fração de 10% (300 enzimas) é disponível comercialmente (FABER, 2004).

Quanto às suas fontes de obtenção, as enzimas podem ser oriundas de células de fungos filamentosos, bactérias, leveduras, plantas ou animais e possui uma ampla variedade de aplicações, nas indústrias de alimentos, químicas e farmacêuticas. Também são muito aplicadas para fins analíticos. A tecnologia enzimática apareceu como área de investigação durante a década de 1960, com a imobilização de enzimas para utilização em processos químicos (KRAJEWSKA, 2004).

Apesar das excelentes perspectivas que apresentam as enzimas como catalisadores, sua aplicação em processos industriais de grande escala são limitados pelo seu alto custo de estabilização em relação ao armazenamento e aplicação. Durante a utilização, a estabilidade diminui devido a alterações no pH, temperatura, atrito, pressão osmótica e um efeito

cumulativo de todos esses fatores em função da duração da sua utilização (ALEKSANYAN e MARKOSYAN, 1986). A imobilização de enzimas em suportes sólidos é uma importante ferramenta para viabilizar a utilização das enzimas, pois possibilita sua reutilização e promove um aumento significativo na estabilidade da mesma (LÓPEZ-GALLEG0 et al., 2005).

### **2.6.1 Enzima $\beta$ -galactosidase**

A enzima  $\beta$ -galactosidase (E.C. 3.2.1.23) é uma proteína usualmente chamada de lactase, ou ainda pelo nome sistemático  $\beta$ -D-galactosídeo-galactohidrolase, é classificada como hidrolase e catalisa, entre outras, a reação de hidrólise da lactose à  $\beta$ -D-galactose e  $\alpha$ -D-glicose (GÉKAS e LOPEZ-LEIVA, 1985; HOLSINGER, 1997; BLANCH e CLARK, 1997; CARMINATTI, 2001; ANDRADE, 2005; OLIVEIRA, 2005; LONGO, 2006).

Durante muitos anos foi usada a  $\beta$ -galactosidase em clínicas médicas para produzir pequenas quantidades de leite com baixo teor de lactose para alimentação de crianças e adultos. No entanto o interesse comercial no produto acentuou-se nos anos sessenta, estimulado pela oportunidade de vender mais leite e pela necessidade de encontrar novas aplicações para o soro de leite (MAHONEY, 1997).

A enzima  $\beta$ -galactosidase também pode ser usada na síntese de galactooligosacarídeos (GOS), que foram amplamente reconhecidos como um oligossacarídeo não digerível, não hidrolisável ou absorvível na parte superior trato intestinal, e passam para o cólon onde são fermentados seletivamente por bactérias intestinais benéficas. Além de seus efeitos prebióticos, estes GOS tem baixa cariogenicidade, baixos valores calóricos e baixa doçura (GROSOVÁ et al., 2009). GOS ocorrem naturalmente em quantidades muito pequenas no leite materno, leite de vaca, mel, e numa variedade de frutas e vegetais. GOS podem ser facilmente fabricados por transgalactosilação enzimática de  $\beta$ -galactosidase a partir da lactose do soro, que está disponível em abundância como um subproduto da indústria de queijo (SAKO, 1999).

#### **2.6.1.1 Principais fontes de $\beta$ -galactosidase**

As  $\beta$ -galactosidasas podem ser encontradas na natureza, distribuídas entre vegetais, em órgãos de animais e também por grande quantidade de micro-organismos, tais como fungos filamentosos, bactérias e leveduras sendo esta última e os fungos as fontes

preferidas para produção da enzima para fins comerciais (GÉKAS e LOPEZ-LEIVA, 1985; ALMEIDA e PASTORE, 2001; NIJPELS *et al.*, 1981; LADERO, SANTOS E GARCIA-OCHOA, 2001; VINHAL, 2001; JURADO *et al.* 2002). Na Tabela 2.5 estão relatadas fontes de obtenção de  $\beta$ -galactosidase.

Tabela 2.5 – Possíveis fontes de obtenção de  $\beta$ -galactosidase

<b>LEVEDURAS</b>	<i>Kluyveromyces (Saccharomyces) lactis</i> <i>Kluyveromyces (Saccharomyces) fragilis</i> <i>Candida pseudotropicalis</i>
<b>BACTÉRIAS</b>	<i>Escherichia coli</i> <i>Lactobacillus bulgaricus</i> <i>Bacillus sp</i> <i>Streptococcus lactis</i>
<b>FUNGOS FILAMENTOSOS</b>	<i>Aspergillus foetidus</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus oryzae</i> <i>Aspergillus phoenecis</i>

Fonte: SHUKLA, 1975.

Nem todas as lactases são aceitas ou reconhecidas como seguras para a utilização na indústria de alimentos, visto que a depender da fonte de obtenção, pode-se oferecer problemas de toxicidade, associados aos extratos brutos de coliformes (GÉKAS e LOPEZ-LEIVA, 1985). A legislação brasileira especifica, por meio da Resolução RDC nº 205/2006, que a enzima lactase utilizada na indústria de alimentos deve ser de origem microbiana, proveniente dos seguintes micro-organismos: *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Candida pseudotropicalis*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces fragilis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Saccharomyces sp* (BRASIL, 2006). Tais espécies são classificadas como *Generally Recognized As Safe* (GRAS) pela *Food and Drug Administration* (FDA), sendo esse um importante critério para aplicações alimentícias (KLEIN, 2010).

As propriedades das diferentes  $\beta$ -galactosidases dependem de sua origem. Em geral, lactases fúngicas possuem pH ótimo de atuação numa faixa ácida (2,5-4,5) enquanto o pH ótimo de atuação de lactases provenientes de leveduras e bactérias está numa região mais neutra (6,0-7,0 e 6,5-7,5, respectivamente). Estas diferentes condições de pH ótimo permitem selecionar a lactase mais apropriada para uma aplicação específica. Assim, lactases fúngicas são mais adequadas para hidrólise de soro ácido, enquanto lactases de leveduras e bactérias são mais apropriadas para hidrólise do soro doce e do leite (GÉKAS e LÓPEZ-LEIVA, 1985).

A Tabela 2.6 apresenta um quadro comparativo das diferentes propriedades de algumas  $\beta$ -galactosidases microbianas.

Tabela 2.6 – Propriedades de algumas lactases microbianas

	<i>Fonte</i>	<i>Peso molecular (KDa)</i>	<i>pH ótimo</i>	<i>pH estabilidade</i>	<i>Temperatura ótima (°C)</i>	<i>Íons Ativadores</i>
<i>Fungos</i>	<i>A. niger</i>	117	3,5-4,5	2,5-8	55-60	Nenhum
	<i>A. oryzae</i>	90	5,0	3,5-8	50-55	Nenhum
<i>Leveduras</i>	<i>K. fragilis</i>	201	6,6	6,5-7,5	37	Mn <sup>+2</sup> , K <sup>+</sup>
	<i>K. lactis</i>	200	6,9-7,3	7-7,75	35-40	K <sup>+</sup> , Mg <sup>+2</sup>

Fonte: MARIOTTI, 2000 SHUKLA, 1975

Apesar das diversas fontes de  $\beta$ -galactosidases serem extensivamente empregadas em diversas tecnologias, há ainda uma grande procura por enzimas com propriedades superiores, tais como melhor estabilidade térmica a pH neutro, ou boa atividade a baixas temperaturas. Algumas fontes originadas de micro-organismos termófilos, são muito interessantes em relação à termoestabilidade da enzima. Enzimas termoestáveis, capazes de permanecer com sua atividade a temperaturas maiores ou iguais a 60°C por prolongados períodos, maiores conversões, ou menores tempos de residência para uma dada taxa de conversão, além de serem menos susceptíveis a contaminação microbiológica (HARJU et al., 2012).

A enzima  $\beta$ -galactosidase pode ser utilizada na forma de enzima solúvel, que é normalmente utilizada em processos batelada e na forma imobilizada, que opera tanto em batelada quanto em operação contínua. Devido ao alto custo da enzima, o sistema de imobilização de  $\beta$ -galactosidase continua a ser mais viável economicamente do que os sistemas enzimáticos livres, uma vez que estes processos podem ser realizados continuamente por oferecerem a possibilidade de reutilização da enzima, além de conferir uma maior estabilidade (SZCZODRAK, 2000). Atualmente  $\beta$ -galactosidase imobilizada tem sido extensivamente utilizada para hidrólise de lactose presente no leite/soro e tem sido testada a sua aplicação para produção de galacto-oligossacarídeos (PANESAR et al., 2010).



## 2.7 Imobilização de Enzimas

De acordo com Chibata (1978), uma enzima imobilizada é definida como “a enzima fisicamente confinada ou localizada numa certa região do espaço com retenção de sua atividade catalítica, a qual pode ser usada repetida e continuamente”. O principal interesse em imobilizar uma enzima é obter um biocatalisador com atividade e estabilidade que não sejam afetadas durante o processo, em comparação à sua forma livre. Porém, não deverão ocorrer alterações estruturais na enzima, como modificações no sítio ativo (VIEIRA, 2009).

Um dos primeiros relatos sobre a utilização de enzimas imobilizadas, de 1916, é sobre a imobilização de invertase em  $\text{Al}(\text{OH})_3$  e em carvão (CAO, 2005). Na década de 60 houve uma considerável difusão dessa técnica, mas foi a partir da década de 70 que houve grande crescimento tanto do número de artigos publicados como do número de patentes registradas referentes ao emprego de enzimas imobilizadas (ROSEVEAR, 1984).

No início dos anos 70, pesquisadores da empresa finlandesa Valio, desenvolveram um método para hidrólise da lactose, utilizando uma enzima própria, a Valio IML, que é uma  $\beta$ -galactosidase imobilizada numa resina adsorvente de qualidade alimentícia. Esse processo rende um grau de hidrólise de até 95%, com as vantagens adicionais de permitir um processamento contínuo e um baixo custo de enzimas. No centro do sistema Valio existe uma coluna com enzimas, Valio IML (*Immobilized Lactase*), as quais, sob condições normais de operações, continuam ativas por vários anos (INSUMOS, 2010).

A prática de se imobilizar enzimas por diversos protocolos de imobilização vem se expandindo extensivamente nos últimos 30 anos, na medida em que seus benefícios são reconhecidos e empregados na produção de alimentos, produtos farmacêuticos e outros produtos biologicamente importantes (MATEO *et al.*, 2007).

A imobilização de enzimas é uma técnica que vem sendo cada vez mais utilizada a fim de melhorar a aplicação industrial das mesmas permitindo um melhor controle da produção e redução de custos. Sabe-se, porém, que não existem técnicas universais ou totalmente eficientes de imobilização de enzimas, mas sim uma gama de possibilidades, parâmetros e aplicações (KLEIN, 2010).

Apesar do processo de imobilização enzimática ter um custo elevado, tanto pelo custo do suporte quanto da enzima, este processo se torna viável, à medida que possibilita utilizar o biocatalisador imobilizado repetidamente, em reações bateladas ou reações contínuas, e em sistemas de reatores tubulares (HARJU *et al.*, 2012).

De acordo com vários autores (SHULER e KARGI, 1992; KRAJEWSKA, 2004; GROSOVÁ et al., 2008; GÓMEZ *et al.*, 2005; SZYMANSKA *et al.*, 2007) pode-se apresentar algumas das principais vantagens da utilização de enzimas imobilizada.

- Maior estabilidade para a enzima, de modo que possa ser utilizado em processos contínuos;
- Permite um grande aproveitamento econômico, pelo fato da possibilidade de sua reutilização;
- Permite o processamento de grandes quantidades de substrato, uma vez que pode ser separado e recuperado o produto da mistura de substrato-produto;
- Promove a reutilização sem um significativo decréscimo da atividade;
- Diminui o volume de reação, pois a enzima imobilizada pode ser utilizada em alta concentração em um menor volume de reator;
- Proporciona um maior controle do processo catalítico;
- Melhora o controle operacional;
- Flexibiliza o projeto do reator;
- A enzima não contamina o produto.

No entanto, após a imobilização as propriedades químicas e físicas das enzimas podem sofrer modificações. Devem ser considerados os efeitos da imobilização sobre a estabilidade, as propriedades cinéticas e especificidade, além da produtividade da enzima. As mudanças nas propriedades das enzimas podem ser causadas por diversos fatores (KENNEDY e CABRAL, 1987; SHELDON, 2007).

- Efeitos conformacionais: modificação conformacional na molécula de enzima devido à alteração na estrutura terciária do sítio ativo.
- Efeitos estereoquímicos: uma parte da molécula da enzima é imobilizada numa posição tal que o sítio ativo é relativamente inacessível.
- Efeitos de partição: este efeito é relatado para a natureza química do material do suporte, podendo surgir interações eletrostáticas e hidrofóbicas entre a matriz e moléculas de baixa massa molecular presente na solução, levando a uma modificação de microambiente.
- Efeitos difusionais ou transferência de massa: surge a partir da resistência de difusão de solução de substrato para os sítios catalíticos e difusão de produtos.

Todos esses fatores podem influenciar nas propriedades da enzima imobilizada que adquirem novas propriedades cinéticas, modificações em seus valores de  $K_m$  e  $V_m$ ,

deslocamento dos valores de pH e comportamentos diferentes de acordo com temperatura (KENNEDY e CABRAL, 1987; MARKOGLOU, 2003).

Entretanto, os problemas citados acima podem ser evitados ou diminuídos pela escolha criteriosa do método de imobilização e suporte adequado, bem como o tipo de solvente, a quantidade de água e a solubilidade dos substratos e produtos devem ser avaliados e otimizados (VIEIRA, 2009).

## **2.8 Métodos de imobilização de enzimas**

Cada enzima é única em suas características e isto influencia na escolha do procedimento de imobilização. Entretanto, a obtenção de um biocatalisador com estabilidade operacional depende da estabilidade do suporte e do tipo de amostra, a qual pode conter diferentes ativadores e/ou inibidores. Como não existe um método ideal ou procedimento geral para a imobilização do componente biológico, a diversidade de métodos existentes permite a escolha de um que promova uma melhor imobilização e menor perda de atividade enzimática (MATEO et al., 2000, PANESAR et al., 2010).

Scouten (1987) considera que todos os métodos possuem vantagens e desvantagens que precisam ser ponderadas e investigadas para todos os biocatalisadores e reação enzimática. Por este motivo, é necessário escolher o procedimento mais simples e barato, que resulte em uma imobilização com boa retenção da atividade e alta estabilidade operacional, para cada aplicação de enzima imobilizada.

Várias técnicas podem ser aplicadas para imobilizar ou confinar as enzimas em suportes sólidos, estando baseadas em mecanismos físicos e químicos. Entre os métodos de imobilização estão: retenção física, que consiste no confinamento das moléculas da enzima em matriz polimérica, microcápsula ou membrana; a imobilização por ligação da enzima a um material insolúvel, e pelo uso de um reagente multifuncional por ligações cruzadas (HAIDER e HUSAIN, 2009), conforme pode ser verificado na Figura 2.6.

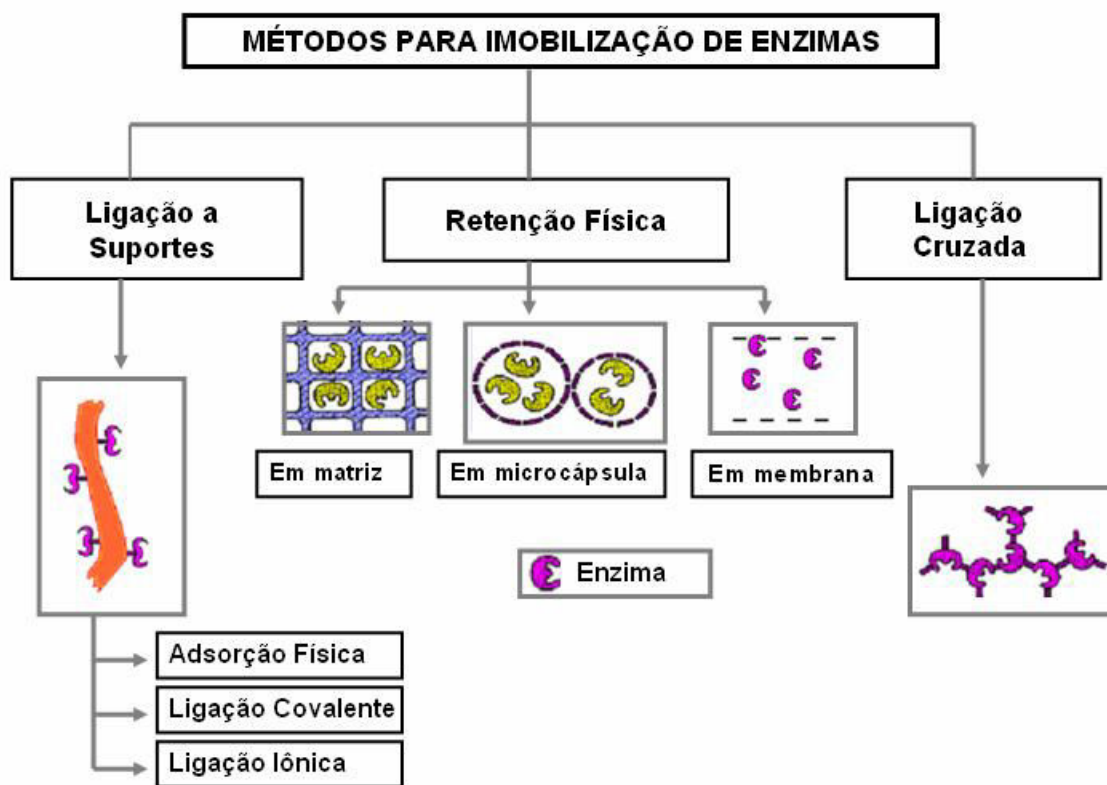


Figura 2.6 - Métodos para imobilização de enzimas (adaptado DALLA-VECCHIA *et al.*, 2004)

O desenvolvimento de técnicas de imobilização tem sido importante por proporcionar a reutilização das enzimas, facilitar a separação dos produtos e aumentar a estabilidade em relação à temperatura e a solventes orgânicos (VIEIRA, 2009).

### 2.8.1 Imobilização por Adsorção Física

O método de adsorção física é considerado o método de imobilização mais simples e baseia-se na adsorção física da enzima na superfície de suportes insolúveis. A enzima fica retida na superfície do suporte insolúvel que se encontra em meio aquoso, por meio de interações de Van der Waals, interações hidrofóbicas, ligações de hidrogênio e interações específicas. Este método promove pouca perturbação sobre a estrutura nativa da enzima, porém, apresenta como desvantagem a dessorção da enzima durante sua utilização (CHIBATA, 1978; BICKERSTAFF, 1997; PANESAR *et al.*, 2010).

O procedimento consiste em misturar a enzima e o material do suporte em condições apropriadas e após um tempo de contato, é feita a separação do suporte imobilizado da

solução em que ele se encontra, por centrifugação ou filtração. A atividade da enzima imobilizada aumenta com a concentração da enzima, aproximando a um valor de saturação a altas concentrações de enzimas (KENNEDY e CABRAL, 1987). A adsorção da enzima é dependente do pH, da natureza do solvente, força iônica, concentração de enzimas e temperatura. O controle dessas variáveis é requerido para uma máxima adsorção e retenção da atividade, devido à ligação fraca entre suporte e enzima. A maior desvantagem desse método é a ligação fraca entre enzima-suporte e a preocupação com as condições de temperatura, pH, força iônica e tipo de solvente estar ou não em condições ótimas para não haver dessorção da enzima durante sua utilização (KENNEDY e CABRAL, 1987). Uma etapa posterior com ligação cruzada contribui para a estabilidade do biocatalisador imobilizado. Reagentes bi ou multifuncionais, como glutaraldeído e disocianato de tolueno podem ser utilizados como agentes de ligação cruzada (WOODWARD, 1984; CAO, 2005).

### **2.8.2 Imobilização por ligações covalentes**

Imobilização de enzimas por ligação covalente é o método mais interessante para a indústria (ARROYO, 1998). Este método de imobilização consiste na retenção da enzima na superfície do suporte pela formação de ligações covalentes. As moléculas de enzima se ligam ao suporte através de certos grupos funcionais, tais como amino, carboxila, hidroxila, e grupos sulfidrilos. Muitas vezes, é aconselhável realizar a imobilização na presença do seu substrato ou um inibidor competitivo com o objetivo de proteger os sítios ativos (PANESAR et al., 2010).

A seleção das condições para imobilização por ligação covalente é mais difícil do que em outros métodos de ligação enzima-suporte. Para alcançar eficiente ligação à funcionalidade do suporte e da enzima, deve-se fazer a ativação do suporte antes da imobilização. Os grupos funcionais do suporte são geralmente ativados utilizando reagentes químicos, tais como, brometo de cianogênio, carbodiimida, e glutaraldeído (KENNEDY e CABRAL, 1987; CAO, 2005).

As condições de reação requeridas para a formação dessas ligações geralmente não são brandas. Em alguns casos, a ligação altera a estrutura conformacional da enzima e o centro ativo da mesma, resultando em diminuição da atividade e mudança de especificidade de substrato. Por outro lado, como a ligação covalente é forte, a enzima imobilizada é estável e não ocorre perda da enzima para a solução, e assim pode influir na alta resistência a

temperaturas, a agentes desnaturantes e a solventes orgânicos em geral. A extensão disso depende das condições do sistema, da natureza da enzima e do tipo de suporte (CHIBATA, 1978; KENNEDY e CABRAL, 1987; MATEO et al., 2005).

A grande variedade de processos covalentes de imobilização e de matrizes com grupos químicos capazes de participarem diretamente ou serem ativados para formar as ligações, faz desse método uma aplicação quase geral. A maior dificuldade é o conhecimento da estrutura da enzima, o que dificulta o estabelecimento de uma regra geral para a imobilização. Dentre os 20 aminoácidos encontrados na estrutura protéica da enzima, os mais reativos para a formação da ligação covalente com o suporte são lisina, cisteína, tirosina e histidina (VICENTE, 2000).

A maioria dos grupos reativos utilizado para imobilização de proteínas (glutaraldeído, brometo de cianogênio, etc.) são capazes de promover ligações enzima-suporte estáveis, proporcionando que a enzima se fixe ao suporte sob condições de imobilização brandas. O elevado grau de reatividade desses grupos os torna muito instáveis a valores de pH alcalino, em que a reatividade dos resíduos Lys pode ser mais adequada para a reação. Desta forma, as enzimas devem ser principalmente imobilizadas através do grupo amino terminal quando se utiliza esses suportes a valores de pH neutros (MATEO et al., 2005).

### **2.8.2.1 Ligação covalente multipontual**

A ligação covalente multipontual consiste na imobilização e estabilização da enzima através da formação de ligação covalente entre grupos amino da enzima ( $-NH_2$ ), e grupos aldeído do suporte. Esses grupos aldeído que se encontram ligeiramente afastados da superfície do suporte, são introduzidos através de sua ativação prévia, e tornam o suporte fortemente eletrofílico para se ligar aos grupos doadores de elétrons dos aminoácidos da superfície da enzima. O ligeiro distanciamento dos grupos aldeído provocado pela ativação permite a formação de ligações multipontuais – bases de Schiff - entre enzima e suporte, ligações adicionais que são menos estáveis, porém que aumentam consideravelmente a estabilidade do derivado obtido, em relação à enzima livre. A possibilidade de que ligações adicionais sejam efetivadas aumenta consideravelmente com o aumento da densidade superficial de grupos aldeídos ativados no suporte (GUISÁN, 1988; MATEO et al., 2005).

Guisán (1988) apontou as razões para escolher os grupos amino dos resíduos de lisina da enzima e o grupo amino terminal para a imobilização multipontual em suportes

ativados. Primeiro, porque a maioria das enzimas apresentam muitos resíduos de lisina que não estão envolvidos no centro catalítico. Segundo, porque os grupos amino são polares e geralmente expostos ao meio na superfície da enzima. Guisán (1988) ainda afirma que a ligação unipontual enzima-suporte é reversível, mas a imobilização torna-se irreversível quando ocorre através de dois ou mais pontos de ligação.

A ligação covalente multipontual promove o enrijecimento da estrutura da enzima imobilizada e reduz mudanças conformacionais envolvidas na sua inativação, conforme apresentado na Figura 2.7 (MARTINEK et al., 1997, MOZHAEV et al., 1990). Embora a imobilização possa ser feita a valores neutros de pH, a incubação a valores de pH alcalinos, onde a reatividade dos nucleófilos da proteína (geralmente lisina) pode ser aumentada, é conveniente para alcançar uma intensa reação entre a enzima e o suporte.

A imobilização de enzimas com ligação covalente multipontual tem sido citada por diversos autores, como uma maneira de aumentar a estabilidade em relação à enzima livre (OTERO et al., 1991; FERNANDEZ-LAFUENTE et al., 1993; MATEO et al., 2000), sendo também capaz de alterar a especificidade e seletividade.

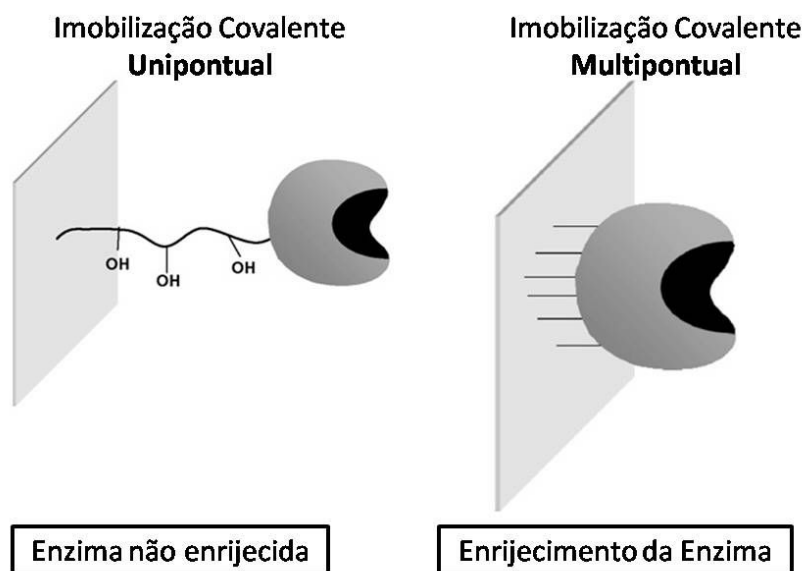


Figura 2.7 – Efeito da imobilização na estabilidade da enzima (MATEO et al., 2007)

Mateo et al. (2007) estudaram a melhoria da estabilidade, atividade e seletividade de enzimas através de técnicas de imobilização e verificaram que a ocorrência de ligações covalentes multipontuais pode aumentar a rigidez da estrutura tridimensional da molécula da enzima, e por consequência, aumentar a estabilidade da enzima imobilizada frente a diferentes

agentes inativantes, tais como, temperatura, pH, solventes orgânicos entre outros. Os autores citaram ainda algumas características requeridas pelo suporte para que a imobilização multipontual de enzima ocorra. Tais características são apresentadas abaixo:

- grande área superficial interna para que se tenha uma boa congruência geométrica com a superfície da enzima. Os poros do suporte devem ter diâmetro suficiente para permitir o fácil acesso da enzima e do substrato.
- alta densidade superficial de grupos reativos, visto que uma intensa ligação covalente multipontual só poderá ser alcançada se houver muitos grupos reativos no suporte.
- Os grupos reativos da proteína e do suporte devem apresentar mínimo impedimento estérico na reação, pois após a imobilização inicial, a ligação covalente multipontual requer um contato entre os grupos ligados e a estrutura rígida.
- Os grupos reativos envolvidos na imobilização devem ser estáveis o suficiente para permitir a reação enzima-suporte por longos períodos.

Apesar de serem esperadas ligações multipontuais quando são utilizados suportes ativados com grupos adequados, a seleção das condições de imobilização adequadas é fundamental para maximizar o processo de imobilização multipontual. As condições de imobilização devem favorecer a reação enzima-suporte (MATEO et al., 2006; BLANCO et al., 1988). Tais condições são apresentadas abaixo:

- **Tempo de reação.** Apesar de que imobilização possa ser relativamente rápida, a interação multipontual entre as superfícies não-complementares da enzima e suporte é um processo lento e dependente do tempo: o processo exige o correto alinhamento de grupos localizados na enzima imobilizada, na enzima parcialmente rígida, e na superfície rígida do suporte.
- **pH.** Embora, em muitos casos a imobilização possa ser realizada em valor de pH neutro, a incubação a valores de pH alcalino, onde a reatividade dos nucleófilos da proteína (geralmente Lisina) pode ser melhorada, é conveniente para chegar a uma alta taxa de reação enzima-suporte. Lembrando que enquanto os grupos aminos terminais devem ter um pK entre 7 e 8, os grupos lisina apresentam um pK maior que 10,5.



- **Temperatura.** Temperatura moderadamente alta pode favorecer a vibração da enzima e suporte, aumentando a possibilidade de ocorrer as ligações enzima-suporte.
- **Tampão.** O tampão deve ser escolhido para que não interfira na reação. Por exemplo, borato pode interferir na reação aldeído-amina.
- **Inibidores ou outras proteínas protetoras.** Imobilização multipontual ou as condições de imobilização pode reduzir a atividade enzimática. A presença de inibidores e outros compostos protegem o sítio ativo da enzima e podem reduzir essa perda na atividade.

### 2.8.3 Ligação cruzada

Além de enzimas imobilizadas em diversos suportes, estudos têm sido realizados objetivando a obtenção de enzimas livres de suporte. Tais biocatalisadores são obtidos utilizando o método de imobilização por ligação cruzada direta em diferentes preparações como enzima dissolvida, enzima cristalizada, enzima liofilizada e enzimas fisicamente agregadas (BRÍGIDA, 2010).

A ligação cruzada é um método livre de suporte e as enzimas estão ligadas umas às outras ou a proteínas inativas (gelatina, albumina), formando uma estrutura tridimensional complexa. Pode ser obtida via métodos físicos ou químicos. Quando obtidas por métodos químicos são resultantes das ligações covalentes entre as enzimas e são favorecidas pelo uso de agentes bi ou multifuncionais, obtendo-se uma enzima quase pura (SHELDON, 2007).

Entre os agentes de ligação cruzada mais usados está o glutaraldeído, que induz a autoreticulação das enzimas, resultando assim, na formação de uma rede tridimensional de moléculas de enzima como pode ser observado pelo mecanismo de reação apresentado na Figura 2.8 (KENNEDY e CABRAL, 1987).

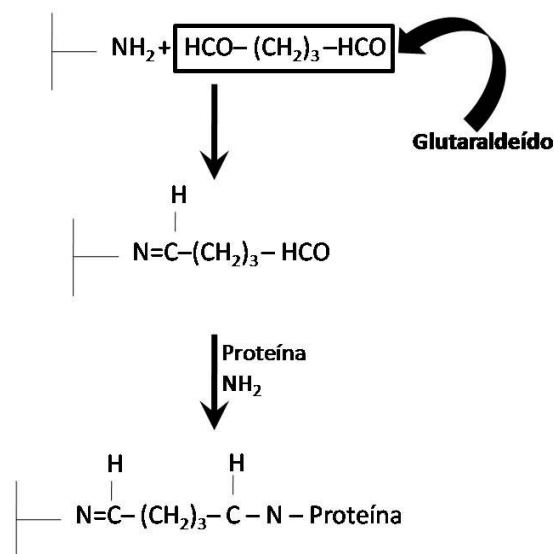


Figura 2.8 – Mecanismo de reação de *cross-linking* com glutaraldeído (WANG, 1976)

Como desvantagem do método está à necessidade de grande quantidade de enzima, resultando em baixas retenções da atividade e baixa estabilidade mecânica, o que dificulta sua aplicação industrial, além de pouca reprodutibilidade. Como alternativas ao método convencional foram desenvolvidos os métodos por ligação cruzada utilizando-se de enzimas cristalinas (CLEC - *cross-linked enzymes crystals*) e o método de formação de agregados físicos, por precipitação, e subsequente entrecruzamento (CLEAs - *cross-linked enzyme aggregates*) das enzimas do agregado (SHELDON, 2007). O uso dos CLEAs tem atraído a atenção, por sua simplicidade, extensa aplicação, alta estabilidade e preservação da atividade (JOSIC et al., 2001; HAGE, 2002).

Alguns fatores influenciam na retenção de atividade e de estabilidade das enzimas imobilizadas por ligação cruzada, tais como o meio de imobilização, a natureza e a quantidade dos agentes ligantes e precipitantes utilizados, temperatura, pH e força iônica. Como não há presença de suportes, as enzimas se suportam em seus aglomerados, o que tornam aquelas que ficam no centro do aglomerado inativas. Essa perda de atividade para formar aglomerados faz com que esta técnica tenha baixa atividade recuperada. Apesar de terem elevada estabilidade a altas temperaturas e a solventes orgânicos, os aglomerados possuem baixa estabilidade mecânica, além de baixa reprodutibilidade, visto que as interações ocorrem ao acaso (BRÍGIDA, 2010; CAO, 2005).

Algumas aplicações industriais tem se restringido ao uso de ligações cruzadas combinado com outros métodos de imobilização, como por exemplo, a ligação iônica seguida de ligação cruzada entre as moléculas da enzima com glutaraldeído, é realizada para melhorar a estabilidade da proteína imobilizada e para obter enzimas imobilizadas com maior atividade (MATEO et al., 2006; CAO, 2005).

## **2.9 Suportes para imobilização de enzimas**

Vários materiais, naturais ou sintéticos, podem ser utilizados como suportes para a imobilização de enzimas e, durante uma seleção para um dado processo de imobilização, as principais propriedades que devem ser analisadas são: área superficial, permeabilidade, insolubilidade, regenerabilidade, morfologia, composição, resistência ao ataque microbiano, resistência mecânica, resistência à compactação em operações a altas vazões quando se utilizam reatores de leito fixos, dentre outras. Contudo, a escolha do suporte para a imobilização não está associada apenas às propriedades químicas e físicas, mas também, e principalmente, da enzima a ser imobilizada e do processo no qual o biocatalisador será aplicado. Logo, pode-se dizer que não há um suporte universal que possa ser aplicado em todas as situações (GALVÃO, 2004; ZANIN, 1989; MESSING, 1975).

Os materiais utilizados como suportes podem ser porosos, não porosos ou apresentar estrutura de gel. Os porosos têm grande área superficial interna disponível para a imobilização e protege a enzima contra turbulências externas, já os não-porosos têm a desvantagem de não possuir grande área para a imobilização, mas elimina o problema de transferência de massa interna, devido à diminuição do tamanho das partículas e pelo aumento de velocidade de escoamento do fluido. Quanto aos géis, estes são utilizados nos casos em que a grade formada seja de tamanho de malha suficiente de modo a reter a proteína sem ocasionar restrições difusionais (GALVÃO, 2004; GONÇALVES, 1996; ZANIN, 1989).

Os suportes porosos são mais adequados para o uso em reatores industriais, por permitirem acomodação de alta carga de enzimas. Eles podem apresentar uma distribuição controlada de poros uniformes ou não. Com a distribuição de poros aleatória somente uma fração destes estará disponível para acomodar as enzimas. Suportes com distribuição controlada de poros são totalmente disponíveis para a imobilização, com um amplo intervalo de diâmetros de poros (COUTINHO FILHO, 2005; KENNEDY e CABRAL, 1987; RIBEIRO, 1989).

O material do suporte deve ser efetivamente inerte, conter um grande número de sítios para a imobilização da enzima e impor a menor quantidade de limitações para a ocorrência da reação. A possibilidade de regeneração, bem como a reutilização da matriz, deve ser considerada na avaliação econômica do sistema com enzima imobilizada. Os suportes são classificados quanto à composição química em: orgânicos (naturais e sintéticos) e inorgânicos (minerais e fabricados) (ZANIN, 1989).

Para o uso industrial, os suportes inorgânicos são mais adequados por apresentarem elevada resistência mecânica, estabilidade térmica, resistência a solventes orgânicos e ao ataque de micro-organismos e fácil regeneração por processo de pirólise. No mais, materiais inorgânicos não apresentam modificação na estrutura em uma larga faixa de pressão, temperatura e pH. Contudo, a maioria das enzimas imobilizadas e comercializadas são obtidas com matrizes orgânicas, provavelmente devido à grande variedade de grupos funcionais reativos que podem ser introduzidos em suportes orgânicos (ROSEVEAR, KENNEDY e CABRAL, 1987).

### **2.9.1 Imobilização em resinas**

A utilização de resina como suporte no processo de imobilização de enzimas é de suma importância na obtenção de biocatalisadores enzimáticos para aplicação nas mais variadas indústrias, tais como: indústria alimentícia, farmacêutica, processos químicos e tratamento de resíduos. A resina de troca iônica permite rápido isolamento e separação ao final da reação, reduzindo o custo operacional de separação da enzima imobilizada do meio reacional (LETCA et al., 2004).

Diferentes tipos de resinas de troca-iônica podem ser produzidos de acordo com a constituição da matriz, grupos de troca, bem como características físico-químicas (RIANI, 2008). A operação de troca iônica é a troca entre íons presentes numa solução e os íons sólidos presentes na resina. As resinas aniônicas trocam seus ânions disponíveis ( $\text{OH}^-$ ) com os ânions do meio até atingir o equilíbrio. As resinas catiônicas são semelhantes, trocam cátions ( $\text{Na}^+$  ou  $\text{H}^+$ ) com o meio (KREMER, 2007).

As resinas de troca iônica sintéticas são constituídas, na sua maioria, por matrizes de copolímeros como estireno-divinilbenzeno ou fenol-formaldeído, na forma de partículas esféricas. Os grupamentos ácidos ou básicos inseridos nos núcleos de benzeno dos monômeros utilizados conferem funcionalidade às resinas (KREMER, 2007).

Entre os grupamentos básicos inseridos nas cadeias das resinas aniônicas, têm-se aminas terciárias que produzem resinas fracamente básicas e os quaternários de amônio, que produzem resinas fortemente básicas. Entre os grupamentos ácidos, o mais comum é o ácido sulfônico, produzindo a resina catiônica fortemente ácida e o menos comum, o ácido carboxílico, produzindo a resina catiônica fracamente ácida (GONZALEZ, 2010).

Segundo fabricante (Rohm Haas) Duolite A568 é uma resina de troca aniônica, fracamente básica, granular e altamente porosa, com matriz de fenol-formaldeído policondensado. Sua estrutura hidrofílica, combinada com uma distribuição controlada do tamanho dos poros, torna esta resina mais adequada para ser utilizada como suporte para imobilização de enzimas em muitos bioprocessos. A força iônica, o tamanho das partículas, tamanho e volume de poro da Duolite A568, foram projetados para otimizar a imobilização de enzimas utilizadas em indústrias de amido, gordura, entre outras indústrias de alimentos.

Dentro do vasto campo da biotecnologia, destaca-se o uso de resinas como suporte para imobilização de enzimas. Encontram-se na literatura vários trabalhos, com diferentes enzimas:

Oosterom et al. (1998) imobilizaram as enzimas  $\beta$ -galactosidases de *Aspergillus orizae* e de *Kluyveromyces fragilis* em uma resina de troca iônica, fenol-formaldeído, tipo Duolite S-761 e Duolite A-7, respectivamente.

Özdural et al. (2003) imobilizaram a enzima  $\beta$ -galactosidase em uma resina de troca iônica fracamente básica, Duolite A568, em um reator de leito empacotado para a obtenção de glicose e galactose.

Letca et al. (2004) testaram algumas resinas de troca iônica em inulase II a partir de uma cepa *Escherichia coli* geneticamente modificada e obteve a melhor atividade para a resina Duolite A568.

Marquez et al. (2008) estudaram a imobilização de invertase em resinas de troca iônica para a hidrólise de sacarose e obtiveram melhor atividade com a resina Duolite A568.

Özdural et al. (2008) imobilizaram  $\beta$ -galactosidase em uma resina de troca iônica fracamente básica, Duolite A568, em um reator contínuo. Concluiu-se que a equação que melhor se ajustou ao estudo cinético foi a de Michaelis-Menten.

Kiasat e Sayyahi (2010) estudaram a imobilização de  $\beta$ -ciclodextrina em resina Dowex comercial utilizando o processo de ligação covalente, e concluíram que o processo foi eficiente e o biocatasador imobilizado obtido apresentou boa atividade.

Guidini *et al.* (2010) estudaram a imobilização  $\beta$ -galactosidase de *Aspergillus oryzae* em resinas de troca iônica para a hidrólise de lactose e obtiveram melhor atividade com a resina Duolite A568.

## 2.10 Reatores enzimáticos

A princípio, quando se dispunha apenas de enzima na forma livre e solúvel, o único tipo de reator utilizável era o de batelada. Contudo, com o advento das enzimas imobilizadas, surgiu a possibilidade de utilização de outros tipos de reatores (SALUM, 2010). Os reatores podem ser divididos em: a) reator batelada, que geralmente ocorre em tanques, onde, terminada a reação, a enzima imobilizada pode ser separada da mistura final com relativa facilidade (filtração ou decantação, por exemplo); b) reator agitado contínuo, onde há entrada e saída contínua de fluido, e eventualmente certa quantidade de enzima pode ser arrastada no efluente, devendo-se, por isso, acoplar na saída um sistema que permita recuperá-la (filtração, por exemplo); c) reator de leito fixo, no qual a enzima imobilizada é empacotada, permanecendo estacionária, enquanto a solução de substrato é bombeada através dela; d) reator de leito fluidizado, no qual a enzima imobilizada encontra-se em suspensão no interior do reator, sendo a solução de substrato bombeada através dela (VITOLLO, 2001). A Figura 2.9 apresenta alguns tipos de reatores enzimáticos.

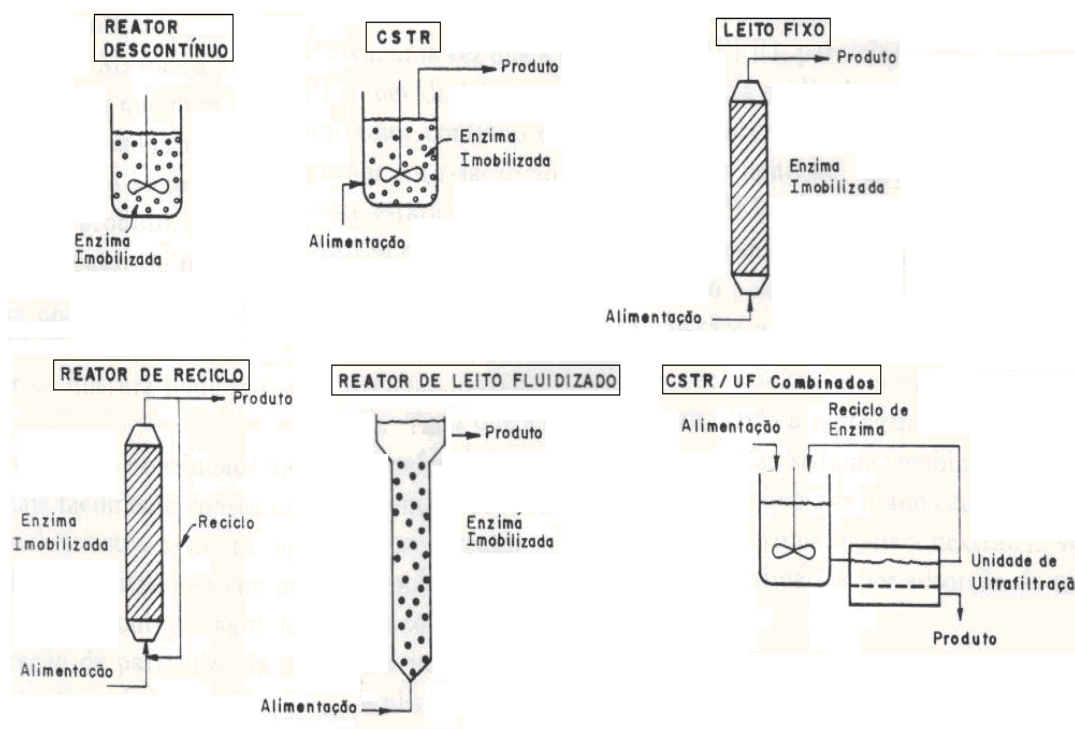


Figura 2.9 – Tipos de reatores enzimáticos (VIETH *et al.*, 1976 apud RIBEIRO, 1989)

A escolha do reator deve ser feita sob observância de diversos fatores que permitam uma adequada mistura do meio sem provocar danos ao biocatalisador imobilizado, visto que uma escolha inadequada do reator pode até provocar rompimento do suporte de imobilização (PILKINGTON *et al.*, 1998; CAO, 2005).

Podemos destacar alguns fatores que devem ser considerados quanto à escolha de um determinado tipo de reator para enzimas imobilizadas são (LIMA *et al.*, 2001):

- Modo de operação:

Descontínuo: menor custo de investimento, mais indicados para processos de pequena escala, utilizados em caráter multi propósito - menor ociosidade.

Contínuo: elevado custo do investimento, desenhado para um processo específico, custo de mão-de-obra reduzido, possibilita automação, apresenta maior produtividade, constância na qualidade dos produtos, fácil controle automático e operacional, estabilização das condições de operação.

- Custo do catalisador frente ao custo total do processo;
- Estabilidade da enzima ao longo do processo;
- Requerimento de transferência de massa;

- Método de imobilização empregado;
- Natureza do substrato;
- Característica do suporte de imobilização utilizado;
- Facilidade de substituição do biocatalisador e sua regeneração;
- Facilidade de construção do reator e custo do mesmo;
- Requisitos operacionais, a saber, possibilitar pleno controle do pH e da temperatura, permitir operar em concentrações não inibitórias de substrato, ser adequado frente às características da matéria-prima.

### 2.10.1 Reatores descontínuos

Também conhecido como reator batelada (*Batch Reactor*), não possui entrada ou saída de material durante o processo, tanto o substrato quanto a enzima são introduzidos no reator no início da reação. À medida que a reação se processa, a concentração de substrato decresce e de produto aumenta com o tempo. Este reator é usado quando se está utilizando enzimas na forma livre e solúvel. Após o surgimento de enzimas imobilizadas, este tipo de reator foi usado em processos onde se desejava uma fácil separação da enzima imobilizada e do meio ao final do processo (CHIBATA, 1978; ROSEVEAR, KENNEDY e CABRAL, 1987).

As vantagens da utilização do reator batelada são: a melhor eficiência na transferência de calor e de massa devido à boa agitação do sistema, melhor controle de contaminação além da flexibilidade em adequar a variações das características da matéria-prima (ZANIN, 1989).

Apesar de o biorreator descontínuo ser o tipo mais simples para modelar e operar, além de ter aplicabilidade múltipla, tem o inconveniente de dificultar a proteção do biocatalisador – uma enzima, por exemplo - contra os efeitos inibitórios causados pelo substrato ou produtos, quando estes estiverem acima de determinada concentração no meio reacional. Neste caso, o chamado processo descontínuo alimentado passa a ser uma alternativa viável, no qual o substrato pode ser adicionado paulatinamente, fazendo com que a sua concentração não alcance o limite inibitório (TOMOTANI e VITOLO, 2006).

O reator batelada de tanque agitado (*Batch Stirred Tank Reactor- BSTR*) é um tipo de reator muito simples, que apresenta um sistema de agitação. Este reator é usado para processos que apresentam solução de alta viscosidade e para enzimas imobilizadas. Para



utilização deste reator com enzimas imobilizadas, foi projetado um reator em mistura tipo cesta, onde as partículas do biocatalisador imobilizado eram colocadas dentro de uma cesta de arame, e esta colocada dentro do reator, evitando assim o atrito entre o agitador e a enzima imobilizada (LEVENSPIEL, 1974).

### 2.10.2 Reatores contínuos

O biorreator contínuo surgiu como um prolongamento do uso da técnica de imobilização de biocatalisadores, introduzida efetivamente no início da década de setenta. Com o biocatalisador ligado por método físico ou químico em matrizes inertes e insolúveis, foi possível operar biorreatores contínuos com diferentes configurações, como colunas com o material imobilizado empacotado (reator de leito fixo) ou mantido suspenso em meio líquido através da alimentação da solução de substrato sob pressão gerada por bomba peristáltica ou pistonada (reator de leito fluidizado) (SILVA, 2010).

O reator CSTR (*Continuous Stirred Tank Reactor*) consiste em um tanque bem agitado, em que o fluxo de substrato é continuamente bombeado para o reator, ao mesmo tempo em que o fluxo do produto é removido. Sua vantagem é a facilidade de construção, a versatilidade, e o baixo custo, que permite a catálise simples, facilidade de carregamento e substituição. Permite controle simples sobre a temperatura, pH da reação e do fornecimento ou remoção de gases. Neste tipo de reator não existem gradientes de temperatura ou de concentração, devido à eficiente agitação que promove contato íntimo entre a enzima e o meio de reação (CHIBATA, 1978; ROSEVEAR et al., 1987; NAJAFPOUR, 2007).

Para CHIBATA (1978), o reator de leito fixo (PBR – *packed bed reactor*) é o mais utilizado na catálise com enzimas imobilizadas e células microbianas. Neste tipo de reator a enzima imobilizada é empacotada, permanecendo estacionária, enquanto a solução de substrato é bombeada através dela. No que se refere ao fluxo do substrato, há três possibilidades: método de fluxo ascendente, fluxo descendente e reciclo. Se ocorrer compactação do leito, é preferível o reator com fluxo ascendente (PRADELLA, 2001).

O reator FBR (*Fluidized Bed Reactor*) é usado quando a solução de substrato tem alta viscosidade e quando há substrato ou produtos gasosos. Neste sistema devem-se tomar alguns cuidados para não haver destruição e decomposição de enzima imobilizada (CHIBATA, 1978). Estes reatores necessitam de uma potência mais elevada para fluidizar o leito, são difíceis de modelar e o projeto do reator deve ser baseado em correções empíricas.

A operação de reatores de membrana é fundamentada na separação de enzimas, produtos e substratos por uma membrana semi-permeável, que estabelece uma barreira seletiva permitindo apenas a passagem do substrato e/ou produto. Os reatores de membrana são divididos em duas categorias: aqueles que operam com substratos de baixo peso molecular, tanto produtos como substratos permeiam a membrana; e aqueles que convertem substratos macromoleculares, somente os produtos permeiam a membrana (PORTACCIO *et al.*, 1998, HATZINIKOLAOU *et al.*, 2005).

### 2.10.3 Problemas operacionais

Os reatores enzimáticos podem apresentar vários problemas operacionais no decorrer do processo, alguns destes problemas são enumerados abaixo:

- Efeitos difusionais;
- Retro-mistura;
- Gradientes de temperatura e pH no interior do reator;
- Variação da pressão interna;
- Queda do desempenho do reator com o tempo.

A queda do desempenho do biorreator com o tempo pode ser devido à perda de enzima pelo reator (desintegração do suporte, solubilização do suporte e/ou liberação da enzima pelo reator-enzima do suporte); interação enzima/substrato deficiente (padrão de fluxo irregular dentro do reator e/ou formação de película sobre as partículas do suporte); perda da atividade enzimática (envenenamento, desnaturação e/ou degradação microbiana); perda do produto (degradação microbiana) e estabelecimento de gradiente de pH no interior do biorreator (LIMA *et al.*, 2001).

Segundo Guidini (2009) as decisões tomadas na concepção do biorreator podem ter um impacto significativo no desempenho do processo global. O conhecimento da cinética das reações é essencial para entender como um reator biológico trabalha. Outras áreas da engenharia de bioprocessos, tal como balanço de massa e energia, transferência de massa e transferência de calor, são também requeridos.

---

## CAPÍTULO 3

### MATERIAL E MÉTODOS

---

Neste capítulo será apresentado o material utilizado no desenvolvimento experimental deste trabalho, bem como a metodologia empregada para tal.

#### 3.1 Enzima

Neste trabalho, utilizou-se a enzima  $\beta$ -galactosidase produzida pelo fungo *Aspergillus oryzae*. Essa enzima foi adquirida comercialmente da empresa Sigma Chemical CO (Sigma-Aldrich), disponível na forma de pó branco. A atividade descrita pelo fabricante foi de 9 unidades por mg de sólido, utilizando lactose como substrato e a unidade de atividade foi definida como 1  $\mu$ mol do substrato reagido por minuto a pH 4,5 e temperatura de 30°C. Os reagentes utilizados nos experimentos apresentavam grau de pureza analítica.

#### 3.2 Suporte para imobilização

O suporte utilizado para imobilização foi a resina de troca iônica Duolite A568 (Rohm Haas), doada pela Dow Chemical Company. Uma amostra desta resina está apresentada na Figura 3.1.

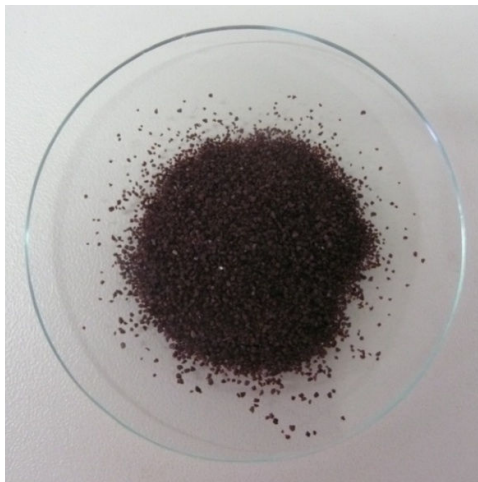


Figura 3.1 – Resina Duolite A568 empregada para imobilização da enzima  $\beta$ -galactosidase

Duolite A568 é um trocador aniônico fracamente básico, baseado em ligação cruzada de fenol-formaldeído, usado como suporte (orgânico sintético) de enzimas em aplicações de

bioprocessos, cujas principais características indicadas pelo fabricante são apresentadas na Tabela 3.1 (Rohm Haas).

Tabela 3.1 – Características da resina Duolite A568 (Rohm Hass)

<b>Características</b>	<b>Propriedades</b>
	<b>Matriz:</b> Fenol-formaldeído
Estrutura hidrofílica	<b>Grupo Funcional:</b> Amina Terciária
	<b>Forma física:</b> Granular
Alta porosidade	<b>Cor:</b> Verde a cinza
	<b>pH:</b> 7,0 – 9,0
Distribuição do tamanho e volume dos poros	<b>Tamanho do poro:</b> 15 a 25 nm
	<b>Volume do poro:</b> 0,78 a 1mL/g
	<b>Densidade:</b> 1,10 a 1,14 g/mL
	<b>Capacidade total de troca iônica:</b> $\geq 1,20$ equivalente/L

De acordo com a Dow do Brasil a Duolite A568 custa US\$ 42.00/L.

### 3.3 Substratos

Para este trabalho utilizou-se os seguintes substratos:

- Solução de lactose em tampão acetato pH 4,5;
- Permeado de soro de leite em pó adquirido comercialmente da empresa SOORO situada em Marechal Cândido Rondon no Estado do Paraná, cujo certificado de análise está apresentado no Anexo A.

### 3.4 Unidade experimental

As unidades experimentais foram montadas no Laboratório de Engenharia Bioquímica da Faculdade de Engenharia Química, onde foram realizados os experimentos com a enzima imobilizada. As unidades experimentais utilizadas são descritas a seguir:

### 3.4.1 Reator tipo cesta (batelada)

O reator batelada (tipo cesta) utilizado consistia em um reator de mistura, de volume útil de 200 mL, dotado de uma camisa externa para circulação de água proveniente de banho termostatzado para controle da temperatura, submetido à agitação magnética. As partículas de enzima imobilizada eram colocadas dentro de uma cesta de aço inox de 100 mesh, e esta colocada dentro do reator, evitando assim o atrito entre o agitador e a enzima imobilizada. O reator de mistura apresentava 8,2 cm de altura e 5,5 cm de diâmetro interno e a cesta de aço inox 6,2 cm de altura e 2,4 cm de diâmetro (Figura 3.2).



Figura 3.2 – Reator tipo cesta

Com o objetivo de otimizar a realização dos experimentos, três reatores foram montados em série, utilizando o mesmo banho termostatzado, como pode ser visto na Figura 3.3.

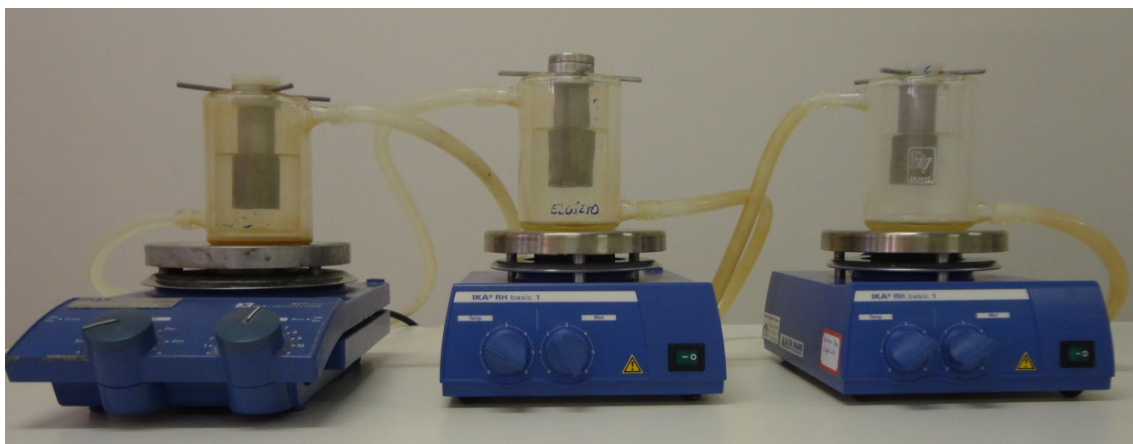


Figura 3.3 – Reatores tipo cesta montados em série utilizando o mesmo banho termostatzado

### 3.4.2 Reator tipo leito fixo com reciclo (contínuo)

A unidade experimental, apresentada na Figuras 3.4, consistia em um reator tipo leito fixo, de volume útil de 21,93 mL, dotado de uma camisa externa para circulação de água proveniente de banho termostatzado para controle da temperatura. O reator tipo leito fixo apresentava 14,55 cm de altura e 1,38 cm de diâmetro. A enzima imobilizada foi empacotada no reator, ocupando um volume 5 mL, restando 16,93 mL de volume reacional. As vazões de entrada e saída do reator eram controladas com o auxílio de uma bomba peristáltica de cabeçote duplo, com escoamento ascendente. O substrato era retirado de um béquer mantido sob agitação magnética. A corrente de reciclo e de saída eram retiradas do tanque pulmão, cujo volume de material era mantido em  $25 \pm 1$  mL. Com auxílio de uma bomba peristáltica, a corrente de reciclo era adicionada à corrente de alimentação do reator utilizando conexão tipo “Y”.



Figura 3.4 –Reator de leito fixo com reciclo

### 3.5 Preparação do biocatalisador

#### 3.5.1 Ativação do suporte

A resina Duolite A568 foi ativada de acordo com a metodologia do fabricante: ácido clorídrico 1 M, na razão de dez volumes de solução por volume de resina, durante 30 minutos em incubadora rotativa a 50 rpm. A seguir foi adicionado hidróxido de sódio 1 M, nas mesmas condições e procedimento realizados para o tratamento ácido. A resina foi lavada com água destilada entre os tratamentos. No final do processo a resina foi lavada com água destilada, filtrada à vácuo por 15 minutos e secas à temperatura ambiente. Para a regeneração do suporte e sua nova utilização foi adotado o mesmo de procedimento de ativação supracitado.

#### 3.5.2 Obtenção do biocatalisador

Com o objetivo de favorecer a formação de ligações multipontuais entre a enzima e o suporte, o processo de obtenção do biocatalisador imobilizado foi dividido em três etapas, imobilização por adsorção em resinas de troca iônica, estabilização pela incubação a pH 9 e

reticulação com glutaraldeído. Os procedimentos empregados para cada uma das etapas estão descritos a seguir.

Imobilização: O processo de imobilização consistiu na adsorção da enzima na resina de troca iônica Duolite A-568. Uma massa de 0,5 g da resina Duolite A-568, previamente ativada conforme item 3.5.1, foi incubada em 10 mL de solução enzimática com concentração definida para cada experimento preparada em tampão acetato de pH 4,5 (razão resina:solução enzimática = 1:20), sob agitação de 150 rpm em incubadora rotativa a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  por 15 horas. As condições de imobilização empregadas foram as encontradas no trabalho de Guidini et al. (2010).

Estabilização: A etapa de estabilização foi realizada pela incubação do derivado enzimático em 10 mL de solução tampão fosfato  $10^{-1}\text{M}$  pH 9 sob agitação de 150 rpm em incubadora rotativa a  $25^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$  por 24 h (MATEO et al., 2000).

Reticulação: O processo de ligação cruzada utilizou glutaraldeído como agente reticulante na razão 1:10 (1 g de resina para 10 mL de solução 3,5 g/L de glutaraldeído). Adicionou-se 5 mL da solução de glutaraldeído 3,5 g/L à enzima imobilizada e manteve-se este sistema sob agitação de 150 rpm e temperatura de  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  por 1,5 horas. As variáveis, concentração do glutaraldeído e tempo, foram definidas conforme estudo realizado por Guidini et al. (2010).

Para operação em reator tipo cesta (batelada) utilizou-se apenas uma amostra do biocatalisador (0,5 g de resina de suporte) obtido conforme procedimentos supracitados, enquanto que para operação em reator de leito fixo (contínuo) foram utilizadas 11 amostras, totalizando de 5,5 g de resina, conforme Fischer (2010).

### 3.6 Preparação do permeado de soro de leite

O permeado de soro de leite foi preparado pela solubilização em água destilada de permeado de soro de leite em pó adquirido comercialmente da empresa SOORO. Para obtenção de solução contendo 50 g/L de lactose, foram utilizadas 53,94 g de permeado de soro em pó para cada litro de substrato, visto que o certificado de análise (Anexo A) informa que o produto possui 92,97% de lactose em sua composição.



### 3.7 Determinação da atividade de $\beta$ -galactosidase imobilizada pelo método das taxas iniciais

Para os experimentos em reator batelada realizados com  $\beta$ -galactosidase imobilizada para hidrólise de lactose usou-se o método das taxas iniciais da reação para determinar a atividade catalítica.

A reação de hidrólise de lactose por  $\beta$ -galactosidase era realizada em um reator conforme item 3.4.1, com um volume de 100 mL de substrato contendo 50 g/L de lactose a 35°C. Para cada experimento era adicionada ao reator uma cesta de aço inox com a enzima imobilizada conforme item 3.5.2.

A unidade de atividade (U) foi definida como grama de glicose produzida por litro do meio por minuto por grama de suporte ( $\text{g}_{\text{glicose}}/\text{L} \cdot \text{min} \cdot \text{g}_{\text{suporte}}$ ). Para cada experimento foram tomadas cinco amostras do meio reacional no intervalo de três em três minutos (3, 6, 9, 12 e 15 min). Cada amostra era colocada em um tubo de ensaio, o qual era tampado e imediatamente colocado em um banho de água em ebulição, por 10 minutos. A glicose formada era dosada pelo método da glicose-oxidase (BAO et al., 2004) conforme Anexo B.

A atividade a partir do método das taxas iniciais, para cada reação da hidrólise de lactose, era obtida pela inclinação das equações lineares de concentração de glicose em função do tempo de reação. Os experimentos foram realizados em triplicata para uma maior confiabilidade nos resultados obtidos. A atividade foi calculada com a curva padrão, conforme Anexo B.

### 3.8 Influência da Etapa de Estabilização na Atividade do Biocatalisador Imobilizado

Para o estudo da influência da etapa de estabilização na atividade do biocatalisador imobilizado foram preparadas três amostras combinando as etapas descritas no item 3.5.2. O primeiro experimento avaliou a influência da aplicação do processo de estabilização na resina antes da imobilização, conforme Lecta et al. (2004), que definiu este processo como “estabilização da resina”. Além disso, foi estudada a influência da realização da etapa de estabilização da enzima imobilizada antes e após a mesma ser submetida ao processo de ligação cruzada com glurataraldeído, no segundo e terceiro experimentos. A atividade de cada derivado enzimático obtido foi determinada conforme descrito no item 3.7. Em todos os experimentos deste estudo utilizou-se solução enzimática com concentração de 16 g/L.

Para o derivado enzimático obtido, quando a enzima foi submetida ao processo de imobilização, seguido de incubação e finalmente exposta à ação do agente reticulante, foram realizados dois experimentos utilizando solução enzimática com concentração de 5 g/L. No primeiro, entre cada etapa para obtenção do biocatalisador imobilizado, lavou-se a resina com tampão acetato pH 4,5, e no segundo experimento foi suprimida a etapa de enxágue da resina com tampão. Para análise da influência da etapa de enxágue foi medida a concentração de proteína, antes e após a imobilização, pelo método de Lowry et al. (1951) conforme Anexo C.

### **3.9 Influência do Tampão na Etapa de Estabilização do Biocatalisador Imobilizado**

Para análise da influência do tampão utilizado na etapa de estabilização, três amostras de  $\beta$ -galactosidase foram submetidas ao processo de imobilização utilizando solução enzimática de 16 g/L, seguido do processo de reticulação e finalmente de estabilização, conforme procedimento descrito no item 3.5.2. Foram empregados tampão borato  $10^{-1}$  M, tampão tris (hidroximetilaminometano)  $10^{-1}$  M e tampão fosfato  $10^{-1}$  M, previamente preparados e ajustados para obter uma solução tamponada com pH 9. Determinou-se a atividade enzimática de cada derivado enzimático conforme item 3.7.

### **3.10 Efeito da adição de substrato durante o processo de imobilização**

Com a finalidade de verificar a influência da presença do substrato durante o processo de obtenção do biocatalisador imobilizado foram preparadas seis amostras combinando as etapas de imobilização e reticulação descritas no item 3.5.2. As duas primeiras amostras foram submetidas apenas ao processo de imobilização padrão, a primeira na ausência e a segunda na presença de 0,5 g de lactose. As quatro amostras seguintes foram obtidas combinando os processo de imobilização e reticulação, sendo que duas amostras foram submetidas à imobilização padrão (ausência de substrato) e em seguida submetidas à ação do agente reticulante na ausência e presença do substrato, respectivamente. As últimas amostras foram imobilizadas na presença de 0,5 g de lactose, em seguida submetidas ao processo de reticulação, uma na presença de 0,25 g de lactose e outra na ausência de substrato. A quantidade de substrato adicionada em cada etapa de obtenção do biocatalisador foi calculada para obter concentração de lactose de 50 g/L. Neste estudo utilizou-se solução

enzimática com concentração de 16 g/L. Determinou-se a atividade enzimática de cada derivado enzimático conforme item 3.7.

### 3.11 Estudo da estabilidade da $\beta$ -galactosidase imobilizada em relação ao pH

O procedimento experimental constituiu em preparar tampões na faixa de pH de 1,5 a 9. Os tampões utilizados foram: ácido clorídrico-cloreto de potássio  $10^{-1}$ M para pH 1,5, citrato  $10^{-1}$ M para pH 3, acetato  $10^{-1}$ M para faixa de pH de 4-5 e fosfato  $10^{-1}$ M para faixa de pH de 6-9. Oito amostras foram submetidas à etapa de imobilização em solução enzimática de 5 g/L, seguido de incubação e finalmente expostas à ação do agente reticulante, conforme procedimento descrito no item 3.5.2. A enzima imobilizada foi lavada com solução tampão pH 4,5 e incubadas em 10 mL de cada tampão. Essas soluções enzimáticas foram mantidas em banho termostatizado à 25°C durante 24 horas. Após esse período, as amostras foram lavadas com tampão acetato de pH 4,5 e determinada a atividade conforme item 3.7. A atividade residual foi calculada relativa à inicial.

### 3.12 Estudo da estabilidade térmica da $\beta$ -galactosidase imobilizada na hidrólise de lactose

Amostras da enzima imobilizada, obtidas pela imobilização em solução enzimática de 5 g/L, seguido de incubação a pH 9 e finalmente exposta a ação do agente reticulante, conforme procedimento descrito no item 3.5.2., foram colocadas em 50 mL de tampão acetato pH 4,5, e incubadas em um banho termostatizado na faixa de temperatura de 55 à 65°C. Para cada temperatura de incubação, os conjuntos de partículas imobilizadas foram retirados do banho em intervalos adequados de tempo: 5 minutos para 65°C, 7 minutos para 62,5°C, 10 minutos para 60°C, 15 minutos para 57,5°C, 20 minutos para 55°C. Estas amostras foram resfriadas rapidamente em banho de gelo e determinada a atividade residual pelo método das taxas iniciais de reação (item 3.7). Os resultados de atividade enzimática residual em função do tempo de incubação, para cada temperatura, foram ajustados aos modelos de desativação térmica de primeira ordem (Equação 3.1), e pela modelagem de desativação enzimática com um estágio (Equação 3.2). Os ajustes foram realizados pelo método numérico de Levenberg-Marquardt, utilizando o software Statística® 7.0, (MORÉ, 1977), para determinar os parâmetros cinéticos pelos melhores ajustes (HENLEY e SADANA, 1985).

$$\frac{A}{A_0} = e^{(-k_d \cdot t)} \quad (3.1)$$

$$\frac{A}{A_0} = (1 - \alpha_1) \cdot e^{(-k_d \cdot t)} + \alpha_1 \quad (3.2)$$

Sendo:

$$\frac{A}{A_0} = \text{Atividade Relativa}$$

$\alpha_1 = \frac{E_1}{E}$  é a razão entre a atividade específica do estado final ( $E_1$ ) para uma modelagem

de inativação com uma única etapa e a atividade inicial ( $E$ );

$k_d$  = constante cinética de desativação térmica

Os tempos de meia vida foram determinados para cada temperatura, considerando o melhor ajuste dos dados experimentais às Equações de desativação térmica (Equações 3.1 e 3.2) utilizando a Equação 3.3 e 3.4, para os modelos de desativação térmica de primeira ordem e em série com uma única etapa, respectivamente. A energia de ativação do processo de desativação térmica foi calculada pela Equação 3.5 por uma regressão linear.

$$t_{1/2} = -\frac{\ln(0,5)}{k_d} \quad (3.3)$$

$$t_{1/2} = -\frac{1}{k_d} \ln \left( \frac{\frac{A}{A_0} - \alpha}{1 - \alpha} \right) \quad (3.4)$$

$$\ln(k_d) = \ln(A^*) - \frac{E_a}{R} \cdot \frac{1}{T} \quad (3.5)$$

$A^*$  = fator de frequência para a reação

$E_a$  = energia de ativação do processo de desativação térmica

$T$  = temperatura absoluta.

$R$  = constante da lei dos gases

### 3.13 Estudo da estabilidade de estocagem da $\beta$ -galactosidase imobilizada

Neste estudo, o biocatalisador obtido pela imobilização em solução enzimática de 5 g/L, seguido de incubação a pH 9 e finalmente exposta a ação do agente reticulante, conforme procedimento descrito no item 3.5.2 foi estocado a 4°C em tampão pH 4,5 por um período de 98 dias. Duas amostras foram estudadas frente à estocagem, uma lavou-se entre as etapas de obtenção do biocatalisador e outra em que a etapa de enxágüe foi suprimida. A atividade residual foi determinada pelo método das taxas iniciais (3.7). A atividade foi calculada relativa à inicial.

### 3.14 Influência da razão de reciclo na hidrólise de permeado de soro de leite em reator de leito fixo com reciclo operando em regime contínuo

O biocatalisador foi obtido pela imobilização em solução enzimática de 5 g/L, seguido de incubação a pH 9 e finalmente exposta a ação do agente reticulante, conforme procedimento descrito no item 3.5.2. Os experimentos foram realizados em reator de leito fixo com reciclo, operando em regime contínuo, escoamento ascendente, nas seguintes condições: permeado de soro de leite preparado conforme item 3.6, vazão de alimentação de 6 mL/min, vazão de reciclo variando de 0 a 6 mL/min e temperatura de reação de  $35 \pm 1^\circ\text{C}$ . Para cada ponto de análise eram retiradas duas amostras, uma imediatamente após o reator e outra na corrente de saída do sistema (Figura 3.5). As amostras eram retiradas depois 40 minutos, após circulação de, no mínimo, uma hora para obtenção do estado estacionário. Para a razão de reciclo que otimizou o processo de hidrólise, foram realizados dois experimentos com vazão de alimentação de 3 mL/min e 1 mL/min. Nestes experimentos seguiu-se a metodologia de amostragem supracitada, entretanto as amostras foram retiradas após 40, 80 e 120 minutos, após circulação de substrato por 30 minutos. A glicose formada era dosada pelo método de glicose oxidase (Anexo B) e o resultado desta análise era utilizado para o cálculo da conversão de lactose, utilizando as Equações 3.6 e 3.7.

$$Convers\tilde{a}o_{Pass\tilde{e}}(\%) = \frac{S_e - S_s}{S_e} \cdot 100\% \quad (3.6)$$

$$Convers\tilde{a}o_{Global}(\%) = \frac{S_o - S_f}{S_o} \cdot 100\% \quad (3.7)$$

Sendo,

$S_e$  – Concentração de substrato na entrada no reator (Calculada por balanço de massa na junção das correntes de alimentação e reciclo)

$S_s$  – Concentração de substrato na saída do reator

$S_o$  – Concentração de substrato no tanque de alimentação

$S_f$  – Concentração de substrato na corrente de saída sistema



Figura 3.5 – Reator de leito fixo com reciclo

### 3.15 Hidrólise de permeado de soro de leite em reator de leito fixo com reciclo operando em regime descontínuo

Para avaliar a conversão de lactose presente no permeado de soro de leite em reator de leito fixo com reciclo operando em regime descontínuo (não possui entrada ou saída de material durante a operação), utilizou-se permeado de soro de leite preparado conforme item 3.6, vazão de reciclo de 1 mL/min e temperatura de reação de  $35 \pm 1^\circ\text{C}$ . O *Start-up* do experimento ocorreu pela operação em regime contínuo durante 60 minutos, com vazão de alimentação de 6 mL/min, para obtenção do estado estacionário. As amostras foram retiradas na saída do reator após 10, 60 e 90 minutos de operação. A glicose formada era dosada pelo

método de glicose oxidase (Anexo B) e o resultado desta análise era utilizado para o cálculo da conversão de lactose em função do tempo de operação.

### **3.16 Estudo da estabilidade operacional da $\beta$ -galactosidase imobilizada**

A viabilidade de reutilização da enzima imobilizada foi analisada durante 40 horas de operação em reator de leito fixo. O biocatalisador obtido pela imobilização em solução enzimática de 5 g/L, seguido de incubação a pH 9 e finalmente exposta a ação do agente reticulante, conforme procedimento descrito no item 3.5.2, foi colocado no reator de leite fixo com reciclo, e submetido ao processo de operação em regime contínuo, escoamento ascendente, nas seguintes condições: permeado de soro de leite preparado conforme item 3.6, vazão de alimentação de 6 mL/min, vazão de reciclo de 3 mL/min e temperatura de reação de  $35 \pm 1^\circ\text{C}$ . Determinou-se a conversão de lactose durante a operação em intervalos de tempo variáveis. A conversão de lactose para cada amostra analisada foi determinada a partir da dosagem de glicose pelo método de glicose-oxidase (Anexo B).

---

## CAPÍTULO 4

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

---

Neste capítulo serão apresentados e discutidos os principais resultados obtidos no desenvolvimento deste trabalho. Inicialmente, apresentam-se os resultados e discussão do estudo do processo de imobilização de  $\beta$ -galactosidase de *Aspergillus oryzae* em Duolite A568 por ligações multipontuais. Na sequência são apresentados a influência do tampão e do substrato no processo de obtenção do biocatalisador imobilizado, além dos resultados referentes à estabilidade em relação ao pH, à temperatura e à estocagem, em relação ao processo de hidrólise de lactose por  $\beta$ -galactosidase imobilizada em reator de leito fixo com reciclo apresentam-se os resultados e discussão do estudo da influência razão de reciclo na conversão global e estabilidade operacional da  $\beta$ -galactosidase imobilizada utilizada neste reator.

#### 4.1 Influência da Etapa de Estabilização na Atividade do Biocatalisador Imobilizado

O estudo da influência da etapa de estabilização na atividade do biocatalisador imobilizado resultou na atividade relativa à atividade enzimática alcançada pelo processo de imobilização por adsorção, seguida de *cross-linking* com glutaraldeído, sem a etapa de estabilização, conforme apresentado na Tabela 4.1.

Tabela 4.1 – Resultado de atividade enzimática em relação à atividade enzimática alcançada pelo biocatalisador imobilizado por adsorção e ligação cruzada

Etapas de obtenção do Derivado enzimático	Atividade relativa (%)
1° Estabilização	119
2° Imobilização	
3° Reticulação	
1° Imobilização	144
2° Estabilização	
3° Reticulação	
1° Imobilização	129
2° Reticulação	
3° Estabilização	



A partir dos dados apresentados na Tabela 4.1, verifica-se que a inserção da etapa de estabilização (incubação em solução tamponada pH 9) aumentou a atividade enzimática em todas as amostras analisadas, independentemente da ordem em que a mesma foi executada, alcançando um incremento de 44% quando a enzima foi submetida ao processo de imobilização, seguido de incubação e finalmente exposta a ação do agente reticulante.

Este aumento de 44% pode ser explicado pela elevação da taxa de imobilização produzida pelo aumento da reatividade dos grupos amino dos resíduos de lisina. Mateo et al. (2005) afirmam em seu trabalho que deve ser considerado que as proteínas podem ter, pelo menos, dois tipos diferentes de grupos amino primários, sendo o grupo amino dos resíduos de lisina o mais abundante, contudo apresenta um pKa relativamente elevado (cerca de 10,5 – 10,8) possuindo baixa reatividade em valores de pH abaixo de 9. Para que a ligação covalente multipontual ocorra de forma intensa é necessário o envolvimento destes grupos amino no processo de obtenção do derivado enzimático (PEDROCHE et al., 2007; BOLIVAR et al., 2009).

Mateo et al. (2000) propuseram um procedimento de imobilização/estabilização enzimática em suporte epóxi-ativado, realizando três etapas, sendo elas, imobilização sob condições experimentais brandas, incubação em condições extremas (altos valores de pH e temperatura, longos períodos de incubação) e bloqueio dos grupos epóxi remanescentes. Os autores mostraram que a etapa de imobilização, em condições brandas, foi fundamental para redução da taxa de inativação da enzima, frente aos agentes inativantes. Este procedimento resultou no aumento, de 5 a 6 vezes, do tempo de meia-vida do biocatalisador enzimático, quando comparado com enzima solúvel ou imobilizada por ligações covalentes unipontuais.

No biocatalisador obtido pelo processo de imobilização seguido de incubação e finalmente exposto a ação do agente reticulante, analisou-se a atividade enzimática obtida ao final de cada etapa de obtenção do mesmo, verificando um aumento gradativo de atividade entre os procedimentos, como pode ser observado na Tabela 4.2.

Tabela 4.2 – Atividade enzimática obtida ao final de cada etapa de obtenção do biocatalisador

Etapas de obtenção do Derivado enzimático	Atividade (U)
Imobilização	$0,722 \pm 0,032$
Imobilização + Estabilização	$0,840 \pm 0,024$
Imobilização + Estabilização + Reticulação	$0,962 \pm 0,021$

A influência da etapa enxágüe entre cada processo de obtenção do biocatalisador foi estudada e os resultados de atividade enzimática e retenção protéica do biocatalisador obtido pela imobilização, seguido da estabilização da enzima e finalmente exposta a ação do agente reticulante, com e sem a etapa de enxágüe são apresentados na Tabela 4.3.

Tabela 4.3 – Resultado para a dosagem de proteína e atividade enzimática para estudo da influência do tampão utilizado na etapa de estabilização

Procedimento empregado	Retenção Proteica(%)	Atividade (U)
Com enxágüe	75	0,568 ± 0,021
Sem enxágüe	88	0,616 ± 0,009

Verifica-se que quando é suprimida a etapa de enxágüe entre os processos de preparação do derivado enzimático, o teor de proteína retida é aumentado em aproximadamente 15%, o que produziu um aumento na atividade enzimática de 8,5%. Com o intuito de verificar o rendimento do processo de imobilização sugerido, foi realizada uma hidrólise com o biocatalisador solúvel (livre) e calculada a atividade enzimática por grama de proteína, o mesmo cálculo foi realizado para a enzima imobilizada pelos processo de adsorção, estabilização e reticulação, sem a etapa de enxágüe (Tabela 4.4).

Tabela 4.4– Resultado para atividade enzimática e rendimento de imobilização

Enzima	Atividade (g glicose/L.min.g proteína)	Rendimento Imobilização (%)
Livre	57,64 ± 3,07	-
Imobilizada	56,37 ± 2,21	97,8

Analisando-se os resultados apresentados na Tabela 4.4 verifica-se a proximidade da atividade catalítica obtida pela enzima livre e imobilizada, resultando em um elevado rendimento de imobilização (97,8%). Este resultado indica que praticamente toda atividade catalítica da enzima livre foi mantida após o processo de imobilização, mostrando que o procedimento adotado foi adequado, visto que não alterou significativamente a eficiência do biocatalisador.

#### 4.2 Influência da Composição do Tampão pH 9 na Atividade do Derivado Enzimático

O estudo realizado para verificar a influência da composição do tampão pH 9, utilizado na etapa de estabilização, mostra que a depender da composição do tampão a atividade do biocatalisador difere marcadamente, como pode ser visto nos resultados apresentados na Tabela 4.5, que mostra a atividade enzimática relativa em relação ao tampão pH utilizado na etapa de estabilização do derivado enzimático.

Tabela 4.5 – Resultado da influência da composição do tampão pH 9 na atividade enzimática

Tipo de Tampão	Atividade relativa(%)
Borato	32
Fosfato	100
Tris	95

Pela análise dos dados apresentados na Tabela 4.4 verifica-se que a escolha do tampão interfere significativamente na atividade do derivado enzimático obtido, uma vez que o emprego do tampão borato reduziu a atividade em aproximadamente 70% quando comparado com a atividade do derivado obtido utilizando tampão fosfato. Este resultado coaduna com o trabalho de Alvaro et al. (1991) no qual foi demonstrado que a utilização de borato (capaz de formar complexos com os aldeídos) reduz a taxa de imobilização e de estabilização do derivado obtido.

Mateo et al. (2006) estudaram o efeito das condições de imobilização para obtenção de derivado enzimático de alta estabilidade utilizando glioxil-agarose como suporte e foi observado que a escolha do tampão pode interferir na reação, visto que há possibilidade do tampão borato interferir na reação aldeído amina.

#### 4.3 Efeito da adição de substrato durante o processo de imobilização

A Tabela 4.6 apresenta os resultados de atividade enzimática obtidos pelo estudo do efeito da adição de substrato durante o processo de imobilização.

A Tabela 4.6 revela que praticamente não há diferenças significativas entre as condições avaliadas. As atividades enzimáticas obtidas quando a enzima foi submetida ao processo de imobilização por adsorção tanto na presença quanto na ausência de substrato

foram semelhantes. Analisando apenas o processo de reticulação, este também não sofreu alterações mediante adição de substrato.

Tabela 4.6 – Resultado do efeito da adição de substrato no processo de imobilização

Amostra	Etapas para obtenção do biocatalisador imobilizado	Atividade enzimática (U)
1	Imobilização	0,722 ± 0,033
2	Imobilização com lactose	0,720 ± 0,023
3	Imobilização + Reticulação	0,680 ± 0,019
4	Imobilização + Reticulação com Lactose	0,662 ± 0,019
5	Imobilização com Lactose + Reticulação	0,588 ± 0,011
6	Imobilização com Lactose + Reticulação com Lactose	0,594 ± 0,017

Estes resultados mostram que a imobilização de  $\beta$ -galactosidase em resina de troca iônica (Duolite A-568) ocorre sem afetar o sítio ativo da enzima, mesmo na ausência de lactose, devido provavelmente ao fato de estar o sítio bem protegido no interior da molécula protéica, não sofrendo, portanto, obstrução ou impedimentos estéricos significativos durante o processo de imobilização. Assim, a adição da lactose como composto protetor do sítio ativo da enzima durante a imobilização não alterou o desempenho do biocatalisador imobilizado, mostrando que o sítio ativo não está diretamente envolvido no processo de imobilização, e que a adição do substrato na imobilização se mostra desnecessária.

Os resultados supracitados coadunam com o trabalho de Aguiar-Oliveira (2012) que estudou o efeito da adição de substrato e sais na imobilização de frutossiltransferase em nióbio, bem como o efeito destes compostos sobre suas propriedades catalíticas. A autora obteve como resultado que a adição da sacarose ao meio de dispersão para adsorção da frutossiltransferase em nióbio revelou uma desaceleração na adsorção. Os resultados da aplicação da enzima imobilizada na presença de substrato na síntese de FOS (fruto-oligossacarídeos) quando comparados com os resultados obtidos utilizando a enzima obtida de forma padrão revelaram que praticamente não há diferenças significativas entre as condições avaliadas. O estudo realizado pela autora conclui que a imobilização da frutossiltransferase em nióbio ocorre sem afetar o sítio ativo da enzima, mesmo na ausência da sacarose, assim, a adição de substrato na imobilização se mostra desnecessária.

Entretanto, autores como Wiltchek e Miron (2003) acreditam que a presença de moléculas do substrato durante o processo de imobilização de uma enzima em um suporte (ou seja, durante a formação das ligações químicas responsáveis pela imobilização) pode proteger seus sítios ativos evitando que estes sejam utilizados como pontos de ligação na imobilização, estes autores afirmam que a imobilização orientada evita que sítios importantes à atividade biocatalítica sejam inviabilizados estericamente ou utilizados para formação das ligações com o suporte como pode acontecer em casos de imobilização aleatória.

Oosterom et al. (1998) a partir do conhecimento de que a presença do substrato ou um inibidor competitivo poderiam proteger o sítio ativo durante o processo de imobilização e ligação cruzada, os autores conduziram o processo de imobilização de  $\beta$ -galactosidase de *Aspergillus oryzae* em Duolite S-761 na presença de 0,1 M de lactose. A atividade enzimática aumentou 30% quando comparado com o processo na ausência de lactose. Contudo, um comportamento diferente foi apresentado quando se utilizou dimetiladipimide (DMA) como agente reticulante, neste caso a presença de lactose não teve efeito na atividade do biocatalisador.

Reetz et al. (1996) observaram que poderiam aumentar consideravelmente a atividade de uma lipase, quando esta era incluída em materiais hidrofóbicos sol-gel em presença de aditivos como polietileno glicol, álcool polivinílico e proteínas como albumina e gelatina e que aditivos com baixo peso molecular como sorbitol, glicerol ou triglicerídeos não apresentam efeito significativo.

#### **4.3 Estudo da estabilidade da $\beta$ -galactosidase imobilizada em relação ao pH**

O pH do meio reacional exerce grande influência na estabilidade catalítica da maioria das enzimas. Na Figura 4.1 são representadas as atividades residuais (%), definidas pela relação entre a atividade após 24 horas de incubação e a inicial.

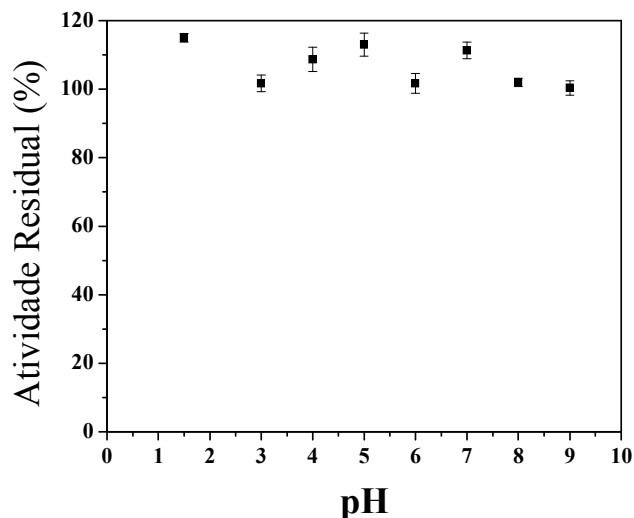


Figura 4.1 – Influência do pH na estabilidade da  $\beta$ -galactosidase imobilizada

Para os resultados de estabilidade da enzima imobilizada obtida pelo processo de imobilização seguido da etapa de estabilização (incubação a pH 9) e finalmente submetida ao processo de ligação cruzada com glutaraldeído observou-se uma alta estabilidade do derivado enzimático em relação ao pH. A atividade enzimática residual foi próxima ou superior a 100% para todos os valores de pH analisados, indicando que além da alta estabilidade, o pH pode promover um incremento na atividade do biocatalisador. A estabilidade do biocatalisador frente ao pH é uma característica essencial para sua aplicação em diferentes produtos, tanto soro como leite.

Os resultados obtidos para estabilidade ao pH estão de acordo com os trabalhos de Lecta (2004), Haider e Husain (2007) e Guidini et al. (2010) que observaram alta estabilidade da enzima  $\beta$ -galactosidase imobilizada e submetida ao processo de ligação cruzada utilizando o glutaraldeído como agente reticulante.

Grazú et al. (2010) após a imobilização de Penicillin G acylase (PGA) a valores de pH neutros para 24 h, realizaram uma incubação adicional do derivado enzimático por 48 horas a pH 10 e obtiveram como resultado, que em todos os casos, mais do que 90% da atividade enzimática foi recuperada após o processo de imobilização-rigidificação. Os autores ainda citam que se a incubação a pH 10 não for possível, isto pode ser compensado pela redução do pH e aumentando o tempo de incubação, visto que a reação covalente entre Lys e grupos reativos do suporte são agora intramoleculares em vez de intermoleculares, e pode acontecer em intervalos de tempo razoáveis a pHs mais baixos do que o pKa de Lys.

A alta estabilidade e o incremento da atividade apresentado pelo biocatalisador após incubação por 24 h em diferentes valores de pH, podem ainda ser explicados pela promoção de ligações covalentes multipontuais pela inserção da etapa de estabilização (incubação à pH alcalino). Este resultado corrobora com o trabalho Mateo et al. (2007) que afirmam que a etapa de estabilização promove uma rigidificação da estrutura melhorando sua estabilidade e que em alguns casos, a enzima pode se apresentar de duas formas com atividades diferentes, e se for possível fixar a enzima na forma de maior atividade, o biocatalisador imobilizado obtido pode ter maior atividade do que a forma nativa da enzima.

O incremento da atividade apresentado nos resultados da estabilidade ao pH pode estar relacionado com a inserção da etapa de estabilização (incubação a pH 9), entre as etapas de imobilização por adsorção e a etapa de reticulação com glutaraldeído, realizada no presente trabalho, visto que não foi observado resultado semelhante em Guidini et al. (2010), que estudou a estabilidade do biocatalisador obtido pela imobilização por adsorção com e sem o processo de ligação cruzada com glutaraldeído.

Segundo o trabalho de Guidini et al, (2010) a enzima submetida apenas ao processo de imobilização por adsorção foi estável em uma estreita faixa de pH de 4 à 5, que coincide com a estabilidade da enzima livre, conforme recomendação do fabricante e citação na literatura por Tanriseven e Dogan (2002), Haider e Husain (2007) e Freitas (2007). Contudo após adição da etapa de reticulação utilizando glutaraldeído, a atividade residual foi da ordem de 100% para a faixa de pH de 2 a 7.

#### **4.4 Estudo da estabilidade térmica da $\beta$ -galactosidase imobilizada na hidrólise de lactose**

A influência da temperatura na estabilidade de  $\beta$ -galactosidase imobilizada foi estudada conforme 3.12. Os resultados das atividades relativas em função do tempo de incubação, nas temperaturas estudadas, estão ilustrados na Figura 4.2.

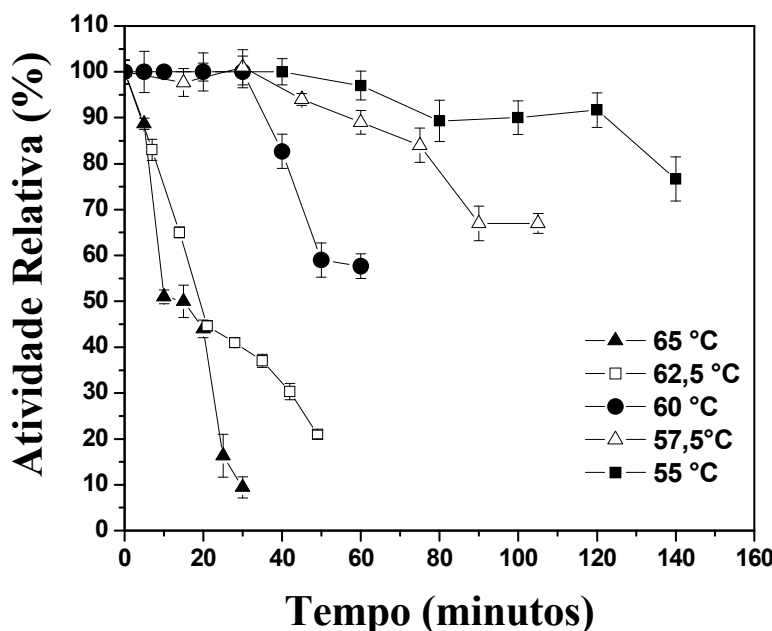


Figura 4.2 - Perfis de inativação térmica para  $\beta$ -galactosidase imobilizada.

A Figura 4.2 evidencia a forte dependência da estabilidade da enzima imobilizada com a temperatura. Observa-se que para a temperatura de 65°C, em 15 minutos houve uma queda de 50% da atividade em relação à inicial. Para a temperatura de 62,5° a inativação enzimática foi um pouco mais lenta, o biocatalisador atingiu 50% de atividade relativa à aproximadamente 20 minutos de incubação. Já para as temperaturas de 60, 57,5 e 55°C foi observado um patamar de estabilidade até os 30 minutos de incubação, a partir daí observa-se o processo de inativação térmica, no qual a queda da atividade catalítica se apresenta mais abrupta com o aumento da temperatura.

Este patamar de estabilidade pode estar relacionado com a inserção da etapa de estabilização na obtenção do biocatalisador, visto que este patamar não foi observado por Guidini et al. (2011) que estudaram a estabilidade térmica da  $\beta$ -galactosidase imobilizada por adsorção seguida de ligação cruzada com glutaraldeído e obtiveram como resultados uma queda de 38,2% da atividade após 14 minutos de incubação à 65°C e um decréscimo de 14,5% na atividade após 140 minutos de incubação à 55°C.

Os resultados apresentados na Figura 4.2 demonstram que para temperaturas mais baixas o biocatalisador imobilizado é mais resistente quanto à perda de atividade, visto que na temperatura de 55° C, o biocatalisador retém praticamente toda a sua atividade após 60



minutos de incubação, e após 140 minutos, o biocatalisador reteve 80% da sua atividade inicial.

Freitas (2007) estudou a estabilidade térmica de  $\beta$ -galactosidase de *Aspergillus oryzae* na forma livre, e obteve para a temperatura de 53°C uma queda de 31,1% da atividade após 275 minutos de incubação. Já para a temperatura de 65°C ocorreu uma rápida desnaturação da enzima, sendo necessários apenas 5 minutos para que a enzima perdesse 80 % de sua atividade catalítica.

Os resultados de atividade enzimática residual do presente trabalho em função do tempo de incubação, para cada temperatura, foram ajustados aos modelos de desativação térmica de primeira ordem (Equação 3.1), e pela modelagem de desativação enzimática com um estágio (Equação 3.2). Para as temperaturas de 60, 57,5 e 55°C, em que foi observado um patamar de estabilidade de 30 minutos para as temperaturas de 60 e 57,5 °C e de 40 minutos para a temperatura de 55°C, foram utilizados somente os pontos experimentais após os seus respectivos patamares de estabilidade, visto que os modelos de desativação térmica estudados no presente trabalho não prevem este comportamento de estabilização inicial. Os ajustes foram realizados pelo método numérico de Levenberg-Marquardt, utilizando o *software* Statística® 7.0, (MORE e WATSON, 1977), para determinar os parâmetros cinéticos pelos melhores ajustes (HENLEY e SADANA, 1985). Os resultados dos coeficientes de determinação para cada equação, a soma dos quadrados dos desvios, com respectivos parâmetros ajustados e análise de significância, utilizando o teste t de *Student*, adotando como parâmetros significativos os que apresentaram níveis de significância menores que 10%, estão apresentados na Tabela 4.7.

Como critério de escolha, optou-se pelo ajuste que mais se adequava aos dados experimentais, adotando inicialmente o modelo que apresentasse significado físico dos parâmetros coerentes com o maior valor do coeficiente de determinação ( $R^2$ ) e o menor valor de soma de quadrado dos desvios.

Tabela 4.7 - Ajustes dos dados experimentais aos modelos de desativação térmica de primeira ordem e em série em uma única etapa para  $\beta$ -galactosidase imobilizada

T (°C)	Equação	$k_d$	Valor - p	$\alpha_1$	Valor - p	R <sup>2</sup>	$\sum(V-V_{mod.})^2$
65	3.1	0,0546	0,0001	-	-	0,92	0,0534
65	3.2	0,0194	0,3685	-1,0477	0,5516	0,95	0,0349
62,5	3.1	0,0313	0,0000	-	-	0,98	0,0077
62,5	3.2	0,0393	0,0101	0,1099	0,2919	0,99	0,0062
60	3.1	0,02110	0,0023	-	-	0,95	0,0067
60	3.2	0,0424	0,3389	0,3785	0,3274	0,96	0,0053
57,5	3.1	0,5238 e <sup>-2</sup>	0,0001	-	-	0,92	0,0078
57,5	3.2	0,6443 e <sup>-5</sup>	0,9995	-700,8321	0,9995	0,94	0,0062
55	3.1	0,2403 e <sup>-2</sup>	0,0004	-	-	0,94	0,0021
55	3.2	0,5291 e <sup>-5</sup>	0,9997	-413,4604	0,9997	0,95	0,0017

Analisando os resultados obtidos para a modelagem de desativação térmica nas temperaturas estudadas, tem-se que para todas as temperaturas o melhor ajuste foi obtido aplicando a cinética de desativação de primeira ordem (Equação 3.1). A desativação em série em uma única etapa foi inviável para o ajuste nestas temperaturas, pois apresentaram valores do parâmetro ( $\alpha_1$ ) negativos e nível de significância maior que 10% ( $p < 0,1$ ), exceto para as temperaturas de 60 e 62,5°C que apresentaram valor positivo para o parâmetro  $\alpha_1$ , contudo o nível de significância obtido foi maior que 10% ( $p < 0,1$ ), tornando-o não significativo pelo teste *t* de Student.

A comparação entre os resultados experimentais de atividade relativa e os preditos pelos dois modelos estão representados nas Figuras 4.3 a 4.7. Os parâmetros ajustados para cada temperatura estão representados nas Equações 4.1 a 4.5:

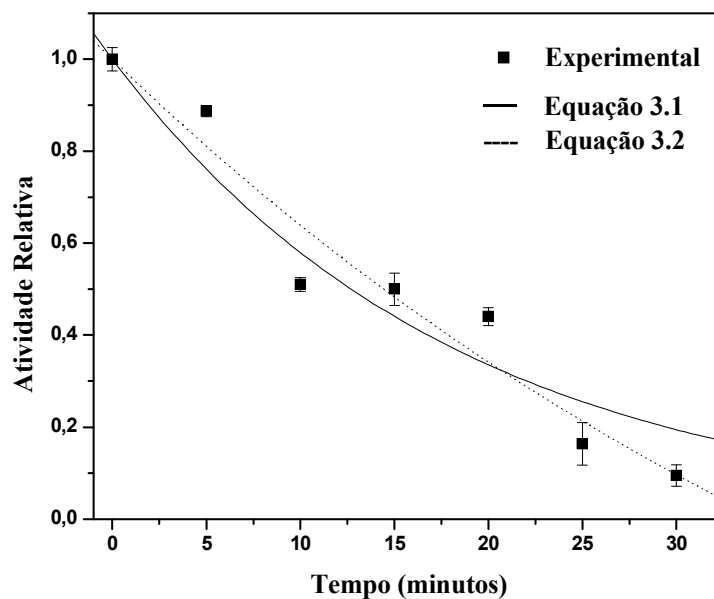


Figura 4.3 - Perfil de inativação térmica a 65°C e pH 4,5 (tampão acetato 0,1 M) para  $\beta$ -galactosidase imobilizada. Ajuste de modelo matemático aos dados experimentais: (—) Equação 3.1= modelo de desativação térmica de primeira ordem; (---) Equação 3.2= modelo de desativação térmica em série em uma única etapa

Analisando a Figura 4.3 verifica-se um bom ajuste entre os valores experimentais e teóricos com o coeficiente de determinação igual a 0,92 e a soma dos quadrados dos desvios igual a 0,0534. O parâmetro ajustado ao modelo de desativação de primeira ordem está representado na Equação 4.1.

$$\frac{A}{A_0} = e^{(-0,0546 \cdot t)} \quad (4.1)$$

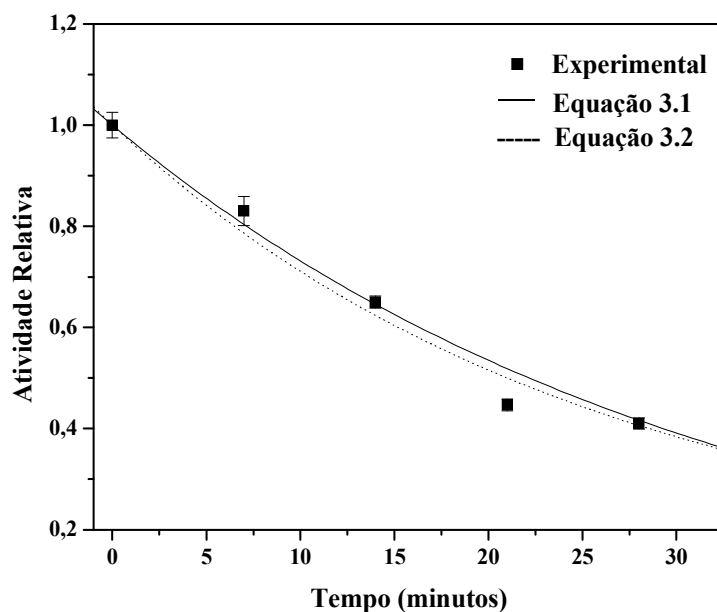


Figura 4.4- Perfil de inativação térmica a 62,5°C e pH 4,5 (tampão acetato 0,1 M) para  $\beta$ -galactosidase imobilizada. Ajuste de modelo matemático aos dados experimentais: (—) Equação 3.1= modelo de desativação térmica de primeira ordem; (---) Equação 3.2= modelo de desativação térmica em série em uma única etapa

A partir dos dados apresentados na Figura 4.4 verifica-se um bom ajuste entre os valores experimentais e teóricos com o coeficiente de determinação igual a 0,98 e a soma dos quadrados dos desvios igual a 0,0077. O parâmetro ajustado ao modelo de desativação de primeira ordem está representado na Equação 4.2:

$$\frac{A}{A_0} = e^{(-0,0313 \cdot t)} \quad (4.2)$$

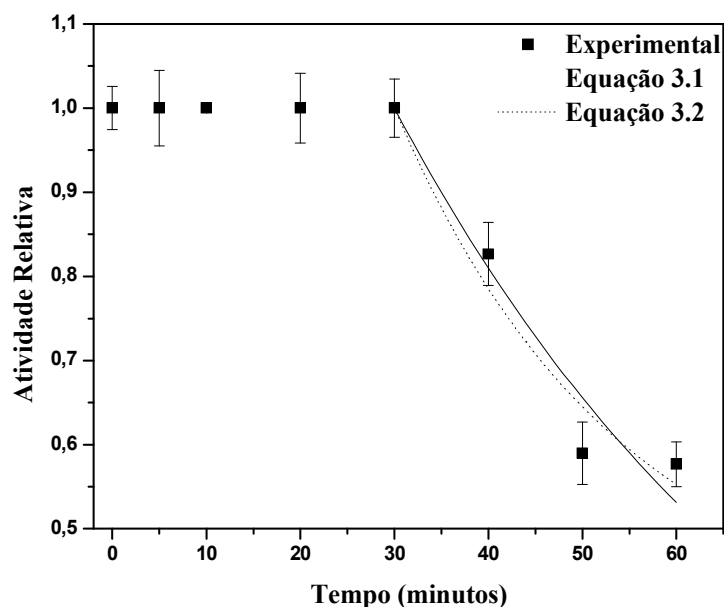


Figura 4.5 - Perfil de inativação térmica a 60°C e pH 4,5 (tampão acetato 0,1 M) para  $\beta$ -galactosidase imobilizada. Ajuste de modelo matemático aos dados experimentais na faixa de 30 a 60 minutos: (—) Equação 3.1= modelo de desativação térmica de primeira ordem; (····) Equação 3.2= modelo de desativação térmica em série em uma única etapa

Analisando a Figura 4.5 verifica-se um bom ajuste entre os valores experimentais e teóricos com o coeficiente de determinação igual a 0,95 e a soma dos quadrados dos desvios igual a 0,0066, para os resultados experimentais na faixa de 30 a 60 minutos de incubação, visto que até 30 minutos de incubação, foi observado um patamar de estabilidade que não é previsto pelos modelos, justificando assim o ajuste dos modelos matemáticos somente na faixa onde foi observado o processo de desativação térmica (30 a 60 minutos). O parâmetro ajustado ao modelo de desativação de primeira ordem esta representado na Equação 4.3:

$$\frac{A}{A_0} = e^{(-0,021095 \cdot t)} \quad (4.3)$$

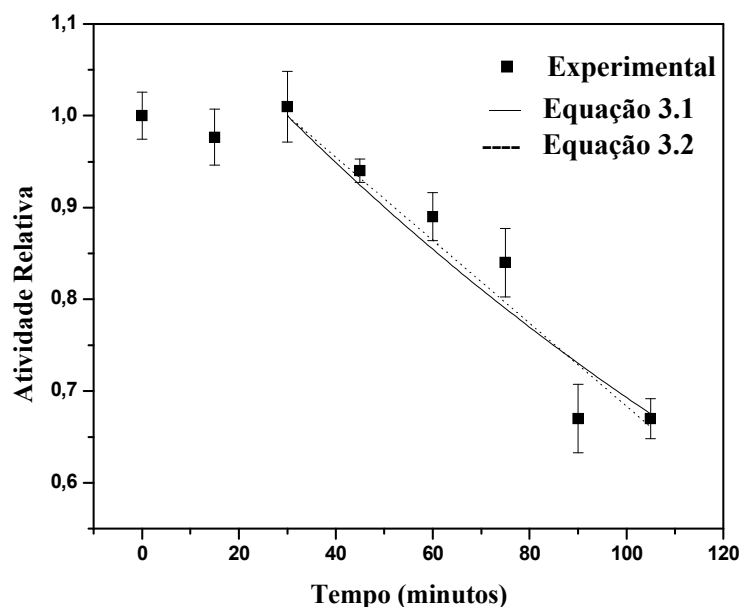


Figura 4.6 - Perfil de inativação térmica a 57,5°C e pH 4,5 (tampão acetato 0,1 M) para  $\beta$ -galactosidase imobilizada. Ajuste de modelo matemático aos dados experimentais na faixa de 30 a 105 minutos: (—) Equação 3.1= modelo de desativação térmica de primeira ordem; (---) Equação 3.2= modelo de desativação térmica em série em uma única etapa.

Analisando a Figura 4.6 pode ser observado que houve um bom ajuste entre os valores experimentais e teóricos com o coeficiente de determinação igual a 0,92 e soma dos quadrados dos desvios igual a 0,0078 para os resultados experimentais na faixa de 30 a 105 minutos de incubação, visto que até 30 minutos de incubação, foi observado um patamar de estabilidade que não é previsto pelos modelos, justificando assim o ajuste dos modelos matemáticos somente na faixa onde foi observado o processo de desativação térmica (30 a 105 minutos). O parâmetro ajustado ao modelo de desativação de primeira ordem esta representado na Equação 4.4.

$$\frac{A}{A_0} = e^{(-0,5238 \times 10^{-2} \cdot t)} \quad (4.4)$$

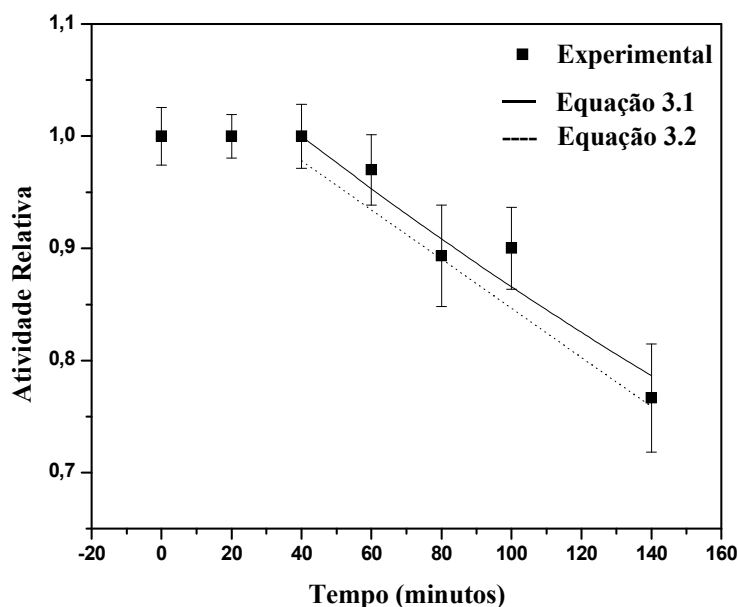


Figura 4.7 - Perfil de inativação térmica a 55°C e pH 4,5 (tampão acetato 0,1 M) para  $\beta$ -galactosidase imobilizada. Ajuste de modelo matemático aos dados experimentais na faixa de 40 a 140 minutos: (—) Equação 3.1= modelo de desativação térmica de primeira ordem; (---) Equação 3.2= modelo de desativação térmica em série em uma única etapa.

Analisando a Figura 4.7 verifica-se que não houve um bom ajuste entre os valores experimentais e teóricos com o coeficiente de determinação igual a 0,94 e soma dos quadrados dos desvios igual a 0,0021 para os resultados experimentais na faixa de 40 a 140 minutos de incubação, visto que até 40 minutos de incubação, foi observado um patamar de estabilidade que não é previsto pelos modelos, justificando assim o ajuste dos modelos matemáticos somente na faixa onde foi observado o processo de desativação térmica (40 a 140 minutos). O parâmetro ajustado ao modelo de desativação de primeira ordem esta representado na Equação 4.5.

$$\frac{A}{A_0} = e^{(-0,2403 \times 10^{-2} \cdot t)} \quad (4.5)$$

Utilizando as constantes de desativação térmica ( $k_d$ ) ajustadas ao modelo de desativação térmica de primeira ordem e a Equação 3.4, foram calculados os tempos de meia-vida para cada temperatura. Para as temperaturas de 60, 57,5 e 55°C, o tempos de meia vida

calculados foram acrescidos do tempo em que o biocatalisador permaneceu estável, sendo que para as temperaturas de 60 e 57,5 °C foi somado 30 minutos e para a temperatura de 55 °C somou-se 40 minutos ao tempo de meia-vida calculado. Os resultados estão apresentados na Tabela 4.8.

Tabela 4.8 - Valores de  $k_d$  e tempos de meia-vida calculados pelo modelo de primeira ordem de desativação térmica

Temperatura (°C)	$k_d$ (min <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>	t <sub>1/2</sub> (min)	t <sub>1/2</sub> (experimental) (min)
65	0,0546	0,92	12,70	15
62,5	0,0313	0,98	22,15	20
60	0,0211	0,95	62,85	-
57,5	0,0052	0,92	163,30	-
55	0,0024	0,94	328,81	-

Os resultados apresentados na Tabela 4.8 corroboram com o trabalho de Fischer (2010), que calculou os tempos de meia-vida utilizando o modelo desativação térmica de primeira ordem para  $\beta$ -galactosidase de *Aspergillus oryzae* imobilizada pela combinação dos processos de adsorção e ligação cruzada para as temperaturas de 65, 63, 60, 57 e 55 °C e obteve como resultados 23,03, 58,24, 126,02, 228,79 e 533,15 min, respectivamente.

No trabalho de Freitas (2007) os tempos de meia-vida calculados utilizando modelo de primeira ordem de desativação térmica para a  $\beta$ -galactosidase de *Aspergillus oryzae* livre para as temperaturas de 65, 63, 61, 57 e 55 °C foram 2,40, 11,68, 13,59, 57,70 e 177,70 min, respectivamente, mostrando claramente que a enzima na forma imobilizada apresenta tempos de meia-vida superiores, ou seja, mais estável em relação à temperatura do meio reacional.

No trabalho de GAUR et al. (2006) a enzima  $\beta$ -galactosidase de *Aspergillus oryzae* foi imobilizada por adsorção em celite, por ligação covalente em quitosana e por ligação cruzada com glutaraldeído, obtendo tempo de meia-vida a 55°C de 18, 14,17 e 17,37 horas, respectivamente. Para 65°C estes valores foram 0,79 e 1,07 horas para as imobilizações em quitosana e ligação cruzada. Verifica-se uma forte dependência da estabilidade térmica da enzima com o método de imobilização utilizado.

Para determinar a energia de ativação do processo de desativação térmica, os resultados de ( $k_d$ ) em função da temperatura (Tabela 4.8) foram ajustados ao modelo de



Arrhenius (Equação 3.5) utilizando o software Origin®7.0, obtendo a Equação 4.6 e Figura 4.8.

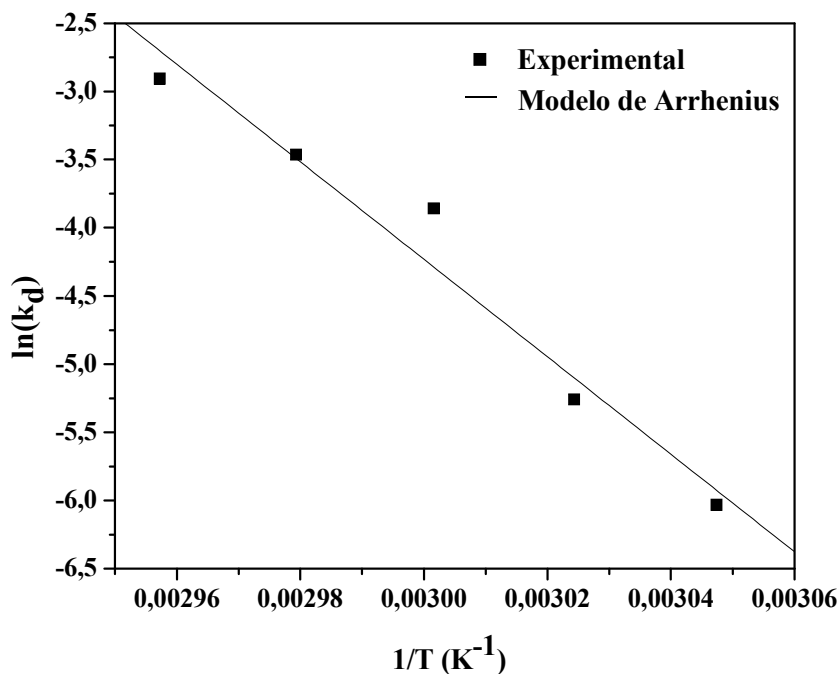


Figura 4.8 – Ajuste do modelo de Arrhenius (—) aos dados experimentais (valores de  $k_d$ )

$$\ln(k_d) = -35750,36 \cdot \frac{1}{T} + 103,02 \quad (4.6)$$

O ajuste linear obtido alcançou coeficiente de determinação de 0,96. Assim a energia de ativação do processo de desativação térmica obtido foi 71,03 kcal/mol. Este valor está próximo ao encontrado por Fischer (2010) que obteve energia de ativação do processo de desativação térmica igual 66,48 kcal/mol para a  $\beta$ -galactosidase imobilizada por adsorção física seguido do processo de ligação cruzada utilizando glutaraldeído como agente reticulante.

Freitas (2007) obteve energia de ativação do processo de desativação térmica igual a 88,14 kcal/mol para a  $\beta$ -galactosidase na sua forma livre. Isto sugere que a enzima imobilizada no presente trabalho é mais estável a um aumento de temperatura no processo de hidrólise de lactose em relação à mesma enzima na forma livre, indicando que o procedimento adotado neste trabalho para obtenção do biocatalisador imobilizado mostrou-se como uma alternativa potencial para elevar a estabilidade do biocatalisador frente à temperatura.

#### 4.5 Estudo da estabilidade de estocagem da $\beta$ -galactosidase imobilizada

Com relação à influência do tempo de estocagem sobre a atividade da  $\beta$ -galactosidase imobilizada (item 3.13), os resultados mostram que as duas amostras analisadas, obtidas com e sem a etapa de enxágue, mantiveram suas atividades após 98 dias de armazenamento em tampão acetato pH 4,5 a  $4 \pm 2^\circ\text{C}$ , conforme pode ser observado na Figura 4.9, indicando a manutenção da estabilidade da enzima frente a estocagem, possibilitando utilizá-la posteriormente.

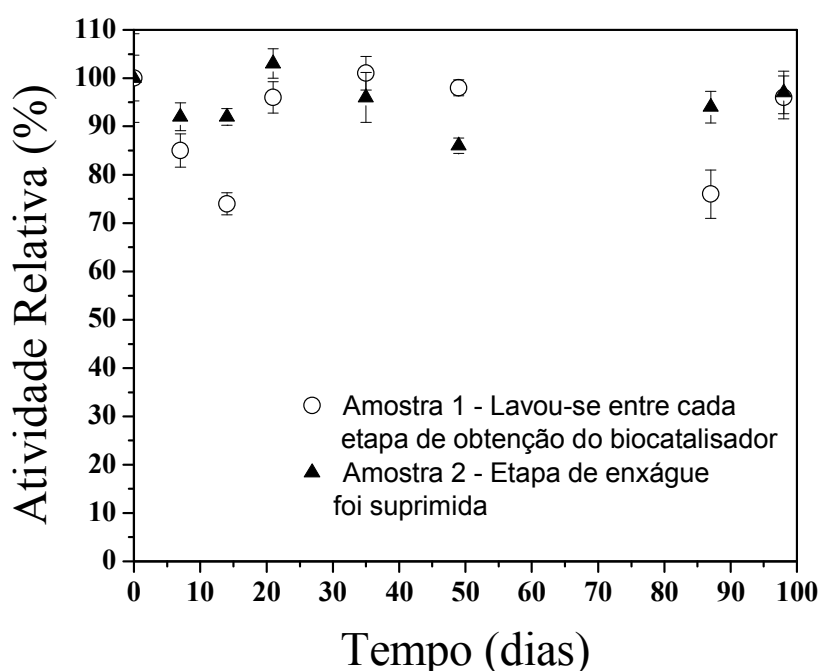


Figura 4.9 - Estabilidade de estocagem da  $\beta$ -galactosidase imobilizada.

Os dados apresentados na Figura 4.9 com relação à influência do tempo de estocagem sobre a atividade da  $\beta$ -galactosidase imobilizada, mostram que as duas amostras analisadas, obtidas com e sem a etapa de enxágue, mantiveram suas atividades após 98 dias de armazenamento em tampão acetato pH 4,5 a  $4 \pm 2^\circ\text{C}$ , contudo os resultados de atividade para o biocatalisador obtido com a etapa de enxágue (Amostra 1) apresentaram oscilações durante as análises realizadas no período de estocagem estudado, este comportamento oscilatório não foi tão evidente na Amostra 2, indicando a manutenção da estabilidade do biocatalisador obtido sem a etapa de enxágue entre os processos de obtenção do biocatalisador imobilizado frente a estocagem, possibilitando seu uso posteriormente.

Estes resultados coadunam com o trabalho de Fischer (2010) que verificou a manutenção da estabilidade da enzima da  $\beta$ -galactosidase de *Aspergillus oryzae*, imobilizada em Duolite A568 pelos processos de adsorção seguido de ligação cruzada, após 90 dias de armazenamento em tampão acetato pH 4,5 a  $4 \pm 2^\circ\text{C}$ .

Segundo Zanin e Moraes (2004) a estabilidade de estocagem das enzimas imobilizadas em solução ou secas, geralmente é superior àquela da enzima livre, porém, isto depende do método de imobilização, do suporte e da solução em que está estocada. Haider e Husain (2007) imobilizaram  $\beta$ -galactosidase de *Aspergillus oryzae* por oclusão em alginato de cálcio, reticulado com concanavalina Ae obtiveram uma atividade de 93% em relação a inicial após 2 meses de estocagem a  $4^\circ\text{C}$ .

Vieira (2009) estudou a influência do tempo de estocagem na atividade hidrolítica da  $\beta$ -galactosidase de *Kluyveromyces fragilis* imobilizada em quitosana, obtendo como resultado a redução da atividade da enzima em 10% em 60 dias e 20% após 90 dias de estocagem a  $10^\circ\text{C}$  e tampão acetato, 0,1 M, pH 4,5.

#### 4.6 Influência da razão de reciclo na hidrólise de permeado de soro de leite em reator de leito fixo com reciclo

A influência da razão de reciclo na hidrólise de permeado de soro em reator de leito fixo com reciclo, operando em regime contínuo foi estudada conforme item 3.14. As conversões por passe e global foram calculadas pelas Equações 4.7 e 4.8 e estão apresentadas na Tabela 4.9.

$$Conversão_{Passe}(\%) = \frac{S_e - S_s}{S_e} \cdot 100\% \quad (4.7)$$

$$Conversão_{Global}(\%) = \frac{S_o - S_f}{S_o} \cdot 100\% \quad (4.8)$$

Sendo,

$S_e$  – Concentração de substrato na entrada no reator (Calculada por balanço de massa na junção das correntes de alimentação e reciclo)

$S_s$  – Concentração de substrato na saída do reator

$S_o$  – Concentração de substrato no tanque de alimentação

$S_f$  – Concentração de substrato na corrente de saída sistema

Tabela 4.9 – Conversão de lactose por passe e global em reator de leite fixo com reciclo em função da vazão de reciclo utilizando permeado de soro com concentração de lactose 50 g/L

<b>Vazão de Reciclo</b> <b>(mL/min)</b>	<b>Conversão (%)</b>	
	<b>Passe</b>	<b>Global</b>
0	-	33,6
1	27,2	33,5
2	30,3	35,4
3	25,1	34,8
4	22,4	30,5
5	23,7	33,0
6	21,9	29,2

Analisando os resultados da Tabela 4.9 verifica-se que a vazão de reciclo não teve grande influência sobre a conversão global do sistema reacional, contudo pode ser observado um aumento desta conversão em relação à conversão por passe em todos os experimentos realizados, alcançando um incremento de aproximadamente 40% da conversão global quando comparado como a conversão por passe alcançada para a mesma condição de operação. O aumento da conversão global em relação à conversão por passe em função da vazão de reciclo é ilustrado na Figura 4.10.

Na Figura 4.10 observa-se que na vazão de 3 mL/min (razão de reciclo igual a 0,5) foi atingido o valor máximo de aumento da conversão global em relação à conversão por passe, indicando que a inserção da corrente de reciclo é uma alternativa viável para melhores rendimentos do processo de hidrólise de lactose do permeado de soro de leite em reator de leite fixo.

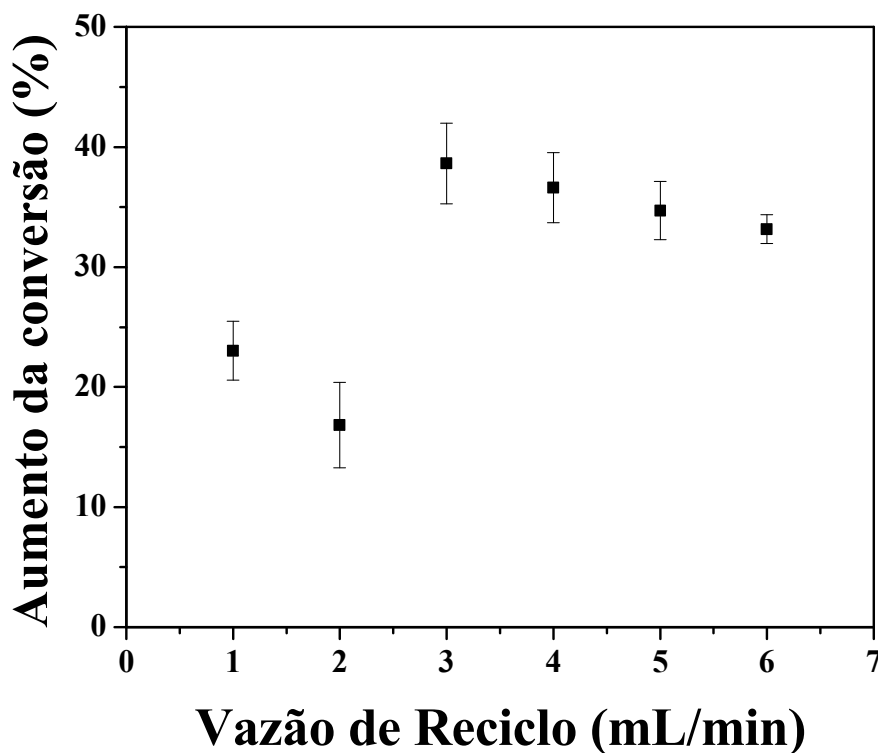


Figura 4.10 - Aumento da conversão global em relação à conversão por passe em função da vazão de reciclo

Com o intuito de aumentar as conversões globais foram conduzidos dois experimentos com vazão de alimentação 3 mL/min e 1 mL/min e mantida a razão de reciclo igual 0,5, visto que esta foi a condição que apresentou o melhor resultado para o processo de hidrólise estudado. As conversões por passe e global para estes experimentos e para o experimento com a vazão de alimentação de 6 mL/min são apresentados na Tabela 4.10.

Tabela 4.10 – Conversão de lactose por passe e global em reator de leite fixo com razão de reciclo igual a 0,5 utilizando permeado de soro com concentração de lactose 50 g/L

Vazão de Alimentação (mL/min)	Conversão (%)	
	Passe	Global
1	73,4	83,8
3	39,3	49,5
6	25,1	34,8

Os resultados apresentados na Tabela 4.10 mostram que a conversão de lactose é aumentada com a diminuição da vazão, como era previsto, haja vista que diminuição da vazão implica em maior tempo de residência do meio reacional no interior do reator. Estes resultados podem ser comparados com Fischer (2010) que realizou a hidrólise em reator de leito fixo operando com vazão de alimentação de 0,6 mL/min de solução de lactose 50 g/L como substrato e obteve 88,2% conversão.

Ansari e Husain (2012) obtiveram conversão de lactose de 92 e 95% utilizando  $\beta$ -galactosidase de *Aspergillus oryzae* imobilizada de duas formas, o primeiro biocatalisador foi obtido por adsorção em Con A-Celite e o segundo biocatalisador foi preparado por combinação dos processos de adsorção em Con A-Celite e ligação cruzada utilizando glutaraldeído como agente reticulante. A hidrólise foi realizada em reator de leito fixo operando com lactose 34,2 g/L com vazão de 0,33 mL/min.

Analisando a Tabela 4.9 e comparando com o trabalho de Fischer (2010) que obteve conversão de lactose de 53% em reator de leito fixo com vazão de alimentação de 6 mL/min, para hidrólise de soro de leite, verifica-se que a conversão alcançada por Fischer (2010) é superior a conversão de 34,8% obtida neste trabalho para operação com vazão de alimentação de 6 mL/min em reator de leito fixo com razão de reciclo igual a 0,5 e permeado de soro de leite como substrato.

Esta diferença pode ser justificada pela influência do pH da solução do substrato na atividade do biocatalisador imobilizado, visto que no trabalho de Fischer (2010) o pH do soro de leite foi ajustado à 4,5, e no presente trabalho foi mantido o pH natural da solução de permeado de soro, com valor de 6,5. Segundo Guidini (2009), que estudou a influência do pH na atividade enzimática do biocatalisador obtido pela combinação dos processos de adsorção e ligação cruzada, para a temperatura reacional de 40°C a atividade do biocatalisador imobilizado foi de 0,221 e 0,647 U para os valores de pH 7,02 e 4,5, respectivamente.

Com o objetivo de viabilizar a aplicação do biocatalisador em processos industriais, foi mantido o pH natural do permeado de soro (pH 6,5), mesmo sabendo da diminuição da atividade do biocatalisador em meio reacional com pH de 6,5, visto que para aplicação industrial o ajuste do pH torna o processo inviável pelo volume de produção, além do mais, o ajuste do pH implica em aumento da concentração de sais no produto final, que não é desejável do ponto de vista alimentício.

#### 4.7 Hidrólise de permeado de soro de leite em reator de leito fixo com reciclo operando em regime descontínuo

Com relação à hidrólise de permeado de soro de leite em reator de leito fixo com reciclo operando em regime descontínuo (item 3.15), os resultados mostram altas conversões de lactose em seus monossacarídeos, como pode ser visto na Tabela 4.11.

Tabela 4.11 – Conversão de lactose em permeado de soro (50 g/L de lactose) em reator de leito fixo com vazão de 1 mL/min operando em regime descontínuo (*loop*)

<b>Tempo</b>	<b>Conversão de lactose</b>
<b>(min)</b>	<b>(%)</b>
0	33
10	66
67	81
90	87

Os resultados apresentados na Tabela 4.11 mostram que apenas 90 minutos de operação são necessários para conversão de 87% da lactose alimentada, sendo necessário uma *scale-up* da unidade operacional para os processos que desejam produções em larga escala.

#### 4.8 Estudo da estabilidade operacional da $\beta$ -galactosidase imobilizada

No desenvolvimento de processos com enzimas imobilizadas, um parâmetro fundamental é a estabilidade operacional. Se a enzima imobilizada for capaz de reter considerável atividade enzimática após vários ciclos de uso, então os processos com enzimas imobilizadas podem ser mais econômicos que os processos com a enzima livre. Dessa forma, haveria uma redução no custo operacional do processo advindo do menor consumo de enzima, além de compensar as despesas adicionais com os processos de imobilização (ZANIN e MORAES, 2004).

A estabilidade operacional da  $\beta$ -galactosidase imobilizada foi analisada durante 40 horas, utilizando permeado de soro como substrato (concentração de lactose 50 g/L), pH 6,5, temperatura de  $35 \pm 1$  °C, reator de leito fixo com escoamento ascendente, vazão de alimentação 6 mL/min e vazão de reciclo 3 mL/min, conforme item 3.16. Os resultados são mostrados na Figura 4.16.

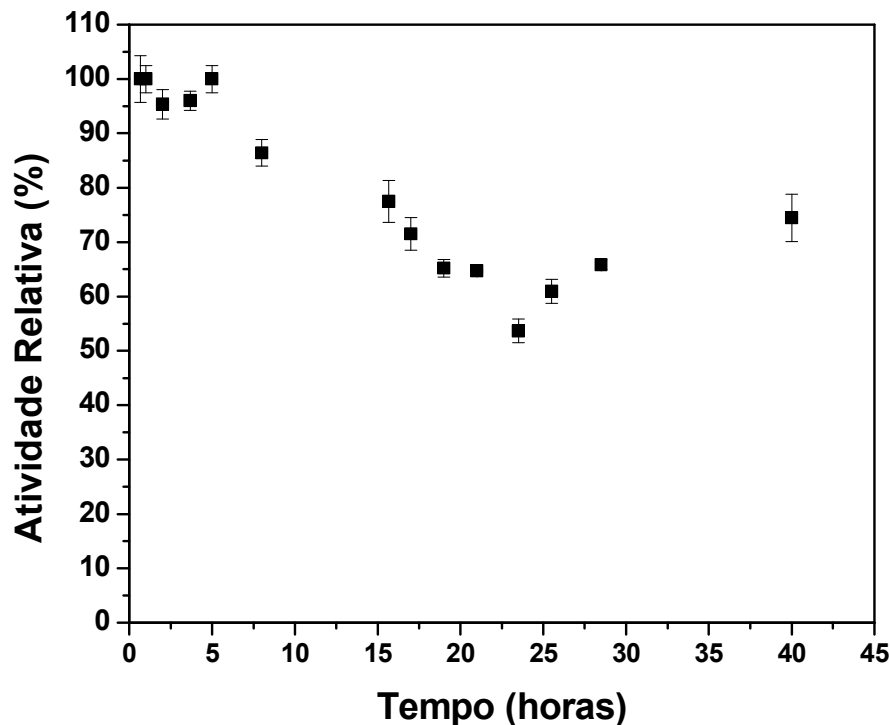


Figura 4.11 - Estabilidade operacional da  $\beta$ -galactosidase imobilizada na hidrólise de lactose em reator de leito fixo com reciclo em regime contínuo.

A enzima imobilizada manteve sua atividade hidrolítica durante 5 horas de operação, correspondente a aproximados 110 tempos de residência, a partir deste tempo observou-se uma fase de declínio na atividade do biocatalisador, chegando ao final de 40 horas de operação (805 tempos de residência) com 70% da atividade catalítica inicial. Esse resultado evidencia que a operação em reator de leito fixo em regime contínuo utilizando permeado de soro como substrato tem menor estabilidade operacional quando comparado com a operação em reator contínuo utilizando solução de lactose como substrato, visto que foi observado incrustações nas mangueiras e aumento da turbidez do meio reacional, indicando que a operação utilizando permeado de soro de leite pode favorecer o entupimento dos poros da resina.

Os problemas operacionais observados, incrustações nas mangueiras e aumento da turbidez do meio reacional, podem estar relacionados com a presença de 4,56% de sais minerais na composição do permeado de soro, como pode ser visto no certificado de análise emitido pelo fabricante (Anexo A). A operação contínua utilizando o permeado de soro como substrato pode implicar num aumento da concentração de sais minerais no meio reacional em



função do tempo de operação, e por consequência uma diminuição da eficiência do sistema, visto que as incrustações observadas nas mangueiras podem estar presentes também na superfície do catalisador diminuindo sua atividade hidrolítica. Uma alternativa para um aumento da estabilidade operacional do sistema em estudo é a realização do processo de desmineralização do substrato antes do mesmo ser submetido ao processo de hidrólise em reator de leito fixo com reciclo.

Em contrapartida aos resultados apresentados na Figura 4.11 que apontam para uma perda da atividade hidrolítica em função do tempo de operação, a percolação de 500 mL de solução tampão pH 4,5 no reator de leito fixo na vazão de 6 mL/min remove as partículas que causavam o entupimento dos poros da resina, recuperando assim a atividade inicial do reator de leito fixo, permitindo sua reutilização.

Fischer (2010) observou a manutenção da atividade hidrolítica após 30 dias de operação em reator de leito fixo com solução de lactose 50 g/L com vazão de alimentação de 0,3 mL/min (aproximadamente 766 tempo de residência).

MARIOTTI *et al.* (2008) estudaram a estabilidade operacional da  $\beta$ -galactosidase de *Aspergillus oryzae* imobilizada em sílica, em reator de leito fixo, utilizando solução de lactose 45 g/L a pH 4,5, na temperatura de 40°C. Obtiveram como resultado, para vazão de alimentação de 0,5 mL/min uma redução de 24% após 130 dias de operação. Para a vazão de alimentação de 5 mL/min o reator operou 130 dias como uma redução de 32% na atividade.

---

## CAPÍTULO 5

### CONCLUSÕES

---

A partir dos resultados obtidos pode-se concluir que:

- O método de obtenção de  $\beta$ -galactosidase de *Aspergillus oryzae* imobilizada em Duolite A568 que resultou na maior atividade catalítica foi a sequência dos processos de imobilização por adsorção, seguido da etapa de estabilização e finalmente submetida ao processo de ligação cruzada com glutaraldeído, alcançando um aumento de 44% da atividade enzimática, quando comparado com a atividade alcançada pelo biocatalisador obtido pela combinação dos processos de adsorção e ligação cruzada;
- O emprego do tampão borato reduziu a atividade em aproximadamente 70% quando comparado com a atividade do derivado obtido utilizando tampão fosfato;
- A adição da lactose como composto protetor do sítio ativo da enzima durante a imobilização não alterou o desempenho do biocatalisador imobilizado, mostrando que o sítio ativo não está diretamente envolvido no processo de imobilização;
- O biocatalisador obtido pelo processo de imobilização seguido de estabilização e finalmente submetida ao processo de ligação cruzada mostrou-se altamente estável em toda a faixa de pH estudada, podendo assim, ser utilizado em processos de hidrólise da lactose proveniente de diversas fontes (leite, soro doce e soro ácido);
- Foi verificada uma forte dependência da enzima imobilizada em relação à temperatura. A 65°C, em 15 minutos houve uma queda de 50% da atividade em relação à inicial. Para as temperaturas de 60, 57,5 e 55°C foi observado um patamar de estabilidade até os 30 minutos de incubação, a partir daí observa-se o processo de inativação térmica;
- O modelo de desativação térmica de primeira ordem se ajustou melhor do que o modelo de desativação em série em uma única etapa para descrever a cinética de desativação térmica da enzima imobilizada;
- A energia de ativação do processo de desativação térmica de  $\beta$ -galactosidase de *Aspergillus oryzae* imobilizada foi 71,03 kcal/mol com tempo de meia-vida de 5,5 horas a 55°C, o que permite aplicação do biocatalisador em processos que

exigem temperaturas moderadas (próximas a 55°C), sem que ocorra perda significativa da atividade do biocatalisador;

- A enzima imobilizada manteve sua atividade após 100 dias de armazenamento, em tampão acetato pH 4,5 a  $4 \pm 2^\circ\text{C}$ , indicando a manutenção da estabilidade da enzima na estocagem;
- A razão de reciclo igual a 0,5 promoveu um incremento de aproximadamente 40% da conversão global quando comparado como a conversão por passe alcançada para a mesma condição de operação;
- A enzima imobilizada, manteve sua atividade durante 110 tempos de residência em reator de leito fixo, com vazão de alimentação de permeado de soro igual a 6 mL/min e vazão de reciclo mantida em 3 mL/min.

---

## CAPÍTULO 6

### SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

---

- Utilizar substratos desmineralizados em reator de leito fixo com reciclo para melhoria da estabilidade operacional do sistema;
- Avaliar o processo de hidrólise de lactose pela enzima  $\beta$ -galactosidase de *Aspergillus oryzae* imobilizada na resina Duolite A568 em reator de leito fluidizado e reator híbrido utilizando soro de leite e leite como substrato.
- Estudar o processo de ligação da enzima ao suporte por microscopia eletrônica de varredura.

---

## CAPÍTULO 7

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

AGUIAR-OLIVEIRA, E. **Estudos sobre as propriedades catalíticas da frutossiltransferase de *Rhodotorula sp.* livre e imobilizada em suporte inorgânico.** 2012. 209 f. Tese (Doutorado em Engenharia de alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2012.

ALEKSANYAN, E. R.; MARKOSYAN, L. S. Microbial  $\beta$ -fructofuranosidase (survey). **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 22, p. 133-145, 1986.

ALMEIDA, E.; ASSALIN, M.R.; ROSA, M.A., DURAN, N. Tratamento de efluentes industriais por processos oxidativos na presença de ozônio. **Química Nova**, v.27, n. 5, p. 818-824, 2004.

ALMEIDA, K.E.; BONASSI, I.A.; ROÇA, R.O. Características físicas e químicas de bebidas lácteas fermentadas e preparadas com soro de queijo minas frescal. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 21, n. 2, p. 187-192, 2001.

ALMEIDA, K.E.; TAMIME, A.Y.; OLIVEIRA, M.N. Influence of total solids contents of milk whey on the acidifying profile and viability of various lactic acid bacteria. **Food Science and Technology**, v. 42, p. 672-678, 2009.

ALMEIDA, M. M.; PASTORE, G. M. Galactooligossacarídeos: Produção e Efeitos Benéficos, **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas: SBCTA, 2001, v. 35, n. 1/2, p. 12-19, 2001.

ALVARO, G.; BLANCO, R.M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GUISAN, J.M. Immobilization-stabilization of penicillin G acylase from *Escherichia coli*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 26, p. 210-214, 1991.

ANDRADE, A.C. de. **Estudo da fermentação simultânea à hidrólise, de soro de queijo, utilizando lactase e *Saccharomyces cerevisiae*.** 2005. 97f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2005.

ANSARI, S. A.; HUSAIN, Q. Lactose hydrolysis from milk/whey in batch and continuous processes by concanavalin A-Celite 545 immobilized *Aspergillus oryzae*  $\beta$  galactosidase. **Food and Bioproducts Processing**, v. 90, n. 2, p. 351- 359, 2012.

ANTUNES, A.E.C.; CAZETTO, T.F.; BOLINI, H.M.A. Iogurtes desnatados prebióticos adicionados de concentrado protéico do soro de leite: perfil de textura, sinérese e análise sensorial. **Alimentos e Nutrição**, v. 15, n. 2, p. 107-114, 2004.

ARROYO, M. Inmovilización de enzimas. Fundamentos, métodos y aplicaciones; **Ars Pharmaceutica**, v. 39, p. 23-29, 1998.

BAILEY J. E.; OLLIS D. F. **Biochemical Engineering Fundamentals**. Second edition. New York, 1986.

BALDASSO, C. **Concentração, Purificação e Fracionamento das proteínas do soro lácteo através da tecnologia de separação por membranas**. 2008 . 179f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio grande do Sul, 2008.

BAO, J., FURUMOTO, K., FUKUNAGA, K., NAKAO, K. A., KOUMATSU, K., YOSHIMOTO, M. Deactivation kinetics of immobilized glucose oxidase for production of calcium gluconate in an external loop airlift bioreactor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 22, p. 33-41, 2004.

BELITZ, H. D.; GROSH, W.; SCHIEBERLE, G. **Food Chemistry**. Germany: Springer, 1114 p., 2009.

BERGAMASCO R.; BASSETTI F.J.; MORAES F.; ZANIN G. M. Characterization of free and immobilized invertase regarding activity and energy of activation. **Brazil Journal Chemical Engineering**, v.17, pp. 4-7, 2000.

BICKERSTAFF, G.F. **Immobilization of Enzymes and Cells**. New Jersey: Human Press., 1997. cap. 1, p. 1-11.

BLANCH, H. W.; CLARK, D. S. Principles of Catalysis. In: **Biochemical Engineering**. New York: Editora Marcel Dekker, 716 p, 1997.

BLANCO, R.M.; CALVETE, J.J.; GUISÁN, J.M. Immobilization-stabilization of enzymes. Variables that control the intensity of the trypsin (amine)- agarose (aldehyde) multi-point covalent attachment. **Enzyme and Microbial Technology**, v.11, p. 353-359, 1988.

BLOWEY, R. W. Factors Affeting Milk Quality. In: **Bovine Medicine**. Diseases and husbandry of cattle.Oxford: Blackwell, 1992, p. 329 – 334, 1992.

BRANDÃO, S.C.C. Soro: Um desafio para as fábricas de queijo. **Leite e Derivados**, n. 15, p. 13-19, 1994.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa n.51. Diário Oficial da União**. Brasília: MAPA, 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 205. Enzimas e Preparações Enzimáticas para Uso na Produção de Alimentos Destinados ao Consumo Humano. **Diário Oficial da União**, Brasília, 14 nov. 2006.

BRÍGIDA, A.I.S. **Imobilização de lipases utilizando fibra da casca de coco verde como suporte para aplicações industriais**. 2010. 193f.Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro, 2010.

BRITO, A.B.N. **Estudo da Cristalização de lactose em diferentes solventes**. 2007. 132f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal de São Carlos, 2007.

BOLIVAR, J.M.; LÓPEZ-GALLEG0, F.; GODOY, C.; RODRIGUES, D.S.; RODRIGUES, R.C.; BATALLA, P.; MARTÍN, J.R.; MATEO, C.; GIORDANO, R.L.C.; GUISÁN, J.M. The presence of thiolated compounds allows the immobilization of enzymes on glyoxyl agarose at mild pH values: New strategies of stabilization by multipoint covalent attachment. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 45, p. 477-483, 2009.

CAMPBELL, M. K. **Bioquímica**. Porto Alegre: Artmed Editora, 2000. 3ª ed, 751p.

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

CAPITANI, C.D.;PACHECO, M.T.B.; GUMERATO, H.F.; VITALI, A.; SCHMIDT, F.L. Recuperação de proteínas do soro de leite por meio de coacervação com polissacarídeo. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 40, n. 11, p. 1123-1128, 2005.

CARMINATTI, C. A. **Ensaio de hidrólise enzimática da lactose em reator a membrana utilizando  $\beta$ -galactosidase *Kluyromyces lactis***. 2001. 66f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Departamento de Engenharia Química – UFSC. 2001.

CASTRO, F.P.; CUNHA, T.M.; OGLIARI, P.J.; TEÓFILO, R.F.; FERREIRA, M.M.C.; PRUDÊNCIO, E.S. Influence of different content of cheese whey and oligofructose on the properties of fermented lactic beverages: Study using response surface methodology. **Food Science and Technology**, v. 42, p. 993-997, 2009.

CHAMPE, P.C.; HARVEY, R.A. Enzimas.In: **Bioquímica Ilustrada**. 2 ed. São Paulo: Artes Médicas, 1989. 446 p.p. 53-66.

CHIBATA I. **Immobilized Enzymes-Research and Development**. Tokyo. Kadansha Ltd. 1978.

COUTINHO FILHO U., RIBEIRO E. J., MAUGERI FILHO F. Estabilidade de invertase imobilizada em sílica. SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS. 15, Recife, 2005.Anais, 2005.

DALLA-VECCHIA, R.; SEBRÃO, D.; NASCIMENTO, M. G.; SOLDI, V. Synthetic applications of immobilized lipases in polymers.**Química Nova**. v. 27, n. 4, p. 623-630, 2004.

DERMIKI, M.; NTZIMANI, A; BADEKA, A.; SAVVAIDIS, I.N.; KONTOMINAS, M.G. Shelf-life extension and quality attributes of the whey cheese “Myzithra Kalathaki” using modified atmosphere packaging. **Food Science and Technology**, v. 41, p. 284-294, 2008.



DURING, M. J.; XU, R.; YOUNG, D.; KAPLITT, M. G.; SHERWIN, R. S.; LEONE, P. Peroral gene therapy of lactose intolerance using an adeno-associated virus vector. **Nature Medicine**, v. 4, p.1131-1135, 1998.

ELNASHAR, M. M. M.; YASSIN, M. A. Lactose hydrolysis by  $\beta$ -galactosidase covalently immobilized to thermally stable biopolymers. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 159, p. 426-437, 2009.

EMBRAPA. **Principais Indicadores Leite e Derivados**: boletim eletrônico mensal. Coordenadores, Glauco Rodrigues Carvalho e Alziro Vasconcelos Carneiro. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, v. 4, n. 32, 08 jul. 2011. Disponível em: <[http://www.cileite.com.br/sites/default/files/2011\\_07\\_indicadores\\_leite.pdf](http://www.cileite.com.br/sites/default/files/2011_07_indicadores_leite.pdf)>. Acesso em: 13 set. 2011.

FABER, K. Biotransformations in Organic Chemistry, Springer-Verlag, Berlin, 5ª ed., 2004.

FARIAS, F. F.; FAGUNDES NETO, U. Intolerância aos Carboidratos. **The Electronic Journal of Pediatric**. v. 8, n. 3, 2004.

FARIAS, F. F.; FAGUNDES NETO, U. Intolerância aos Carboidratos. **The Electronic Journal of Pediatric**. v. 8, n. 3, 2004.

FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; ROSELL, C.M.; RODRÍGUEZ, V.; SANTANA, M.C.; SOLER, G.; BASTIDA, A.; GUISÁN, J.M. Preparation of activated support containing low pK amino groups. A new tool for protein immobilization via the carboxyl coupling method. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 15, p. 546-550, 1993.

FISCHER, J. **Hidrólise de lactose por  $\beta$ -galactosidase de *Aspergillus oryzae* imobilizada em reator de leito fixo**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, Minas Gerais, 136 p., 2010.

FOGLER, H. S. **Elements of Chemical Reaction Engineering**. New Jersey: Prentice Hall, 1992. 2ª ed., 838p.

FREITAS, F.F, **Otimização do processo de imobilização de  $\beta$  - galactosidase de *Aspergillus oryzae* em alginato de sódio com gelatina e glutaraldeído**, Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, Minas Gerais, Brasil, 2007.

FRYE, R.E. **Lactose intolerance**. Clínica Fellow, Departamento de Neurologia, Hospital de Crianças de Boston, Escola Médica Harvard, 2002.

GALVÃO C. M. A. **Hidrólise controlada de proteínas do soro láctico usando tripsina e quimotripsina imobilizadas em diferentes suportes**. Tese (Doutorado em Engenharia Química). São Carlos, SP. 2004, 191p.

GÄNZLE M.G., HAASE G., GELLEN P. Lactose: Crystallization, hydrolysis and value-added derivatives. **International Dairy Journal**, v.18, p. 685-694, 2008.

GAUR, R.; PANT, H.; JAIN, R.; KHARE, S. K. Galacto-oligosaccharide synthesis by immobilized *Aspergillus oryzae*  $\beta$ -galactosidase. **Food Chemistry**, v. 97, p.426-430, 2006.

GÉKAS, V.; LOPEZ-LEIVA, M. Hidrolysis of lactose: A Literature Review. **Process Biochemistry**, v. 20, pp. 2-12, 1985.

GIROTO, J.M.; PAWLOWSKY, U. O soro de leite e as alternativas para o seu beneficiamento. **Brasil Alimentos**, n. 10, p. 43-46, 2001.

GÓMEZ, L., RAMÍREZ H. L., VILLALONGA M. L., HERNÁNDEZ J., VILLALONGA R. Immobilization of chitosan-modified invertase on alginate-coated chitin support via polyelectrolyte complex formation. **Enzyme and Microbial Technology**, 2005.

GONÇALVES, L.R.B. **Estudo do processo de obtenção de etanol a partir de amido liquefeito, usando enzima e micro-organismos coimobilizados em gel de pectina**. São Carlos, 1996, 114 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) Programa de pós graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos.

GONZALEZ, L. V. Troca Iônica. Rio Janeiro: Pontificia Universidade Católica do Rio de Janeiro. Disponível em: <[http://www.dema.puc-rio.br/cursos/OUTecAmb/Troca\\_Ionica.ppt](http://www.dema.puc-rio.br/cursos/OUTecAmb/Troca_Ionica.ppt)>. Acesso em março/2010.

GRAZÚ, V.; LÓPEZ-GALLEGO, F.; MONTES, T.; ABIAN, O.; GONZÁLEZ, R.; HERMOSO, J.A.; GARCÍA, J.L.; MATEO, C. GUIÁN, J.M. Promotion of multipoint covalent immobilization through different regions of genetically modified penicillin G acylase from *E. coli*. **Process Biochemistry**, v.45, p. 390-398, 2010.

GROSOVÁ, Z.; ROSENBERG, M.; GDOVIN, M.; SLÁVIKOVÁ, L.; REBROS, M. Production of d-galactose using  $\beta$ -galactosidase and *Saccharomyces cerevisiae* entrapped in poly(vinylalcohol) hydrogel. **Food Chemistry**, vol. 116, n. 1, pp. 96–100, 2009.

GROSOVÁ, Z.; ROSENBERG, M.; REBROS, M. Perspectives and Applications of Immobilized  $\beta$ -galactosidase in Food Industry – a Review. **Czech Journal of Food Science**, Praha, vol. 26, n. 1, p. 1-14, 2008.

GUIDINI, C.Z. **Imobilização de  $\beta$ -Galactosidase de *Aspergillus oryzae* em Resinas de Troca Iônica**. 2009. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.

GUIDINI, C.Z.; FISCHER, J.; SANTANA, L.N.S.; CARDOSO, V.L.; RIBEIRO, E.J. Immobilization of *Aspergillus oryzae*  $\beta$ -galactosidase in ion exchange resins by combined ionic-binding method and *cross-linking*, **Biochemical Engineering Journal**, v. 52, p. 137-143, 2010.

GUIDINI, C. Z.; FISCHER, J.; RESENDE, M. M.; CARDOSO, V. L.; RIBEIRO, E. J.  $\beta$ -Galactosidase of *Aspergillus oryzae* immobilized in an ion exchange resin combining the ionicbinding and crosslinking methods: Kinetics and stability during the hydrolysis of lactose. **Journal Of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, v.71, p. 139–145, 2011.

GUIÁN, J.M. Aldehyde gels as activated support for immobilizationstabilization of enzymes. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 10, p. 375-382, 1988.

HA, E.; ZEMEL, M.B. Functional properties of whey, whey components, and essential amino acids: mechanisms underlying health benefits for active people (Review). **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 14, p. 251-258, 2003.

HAGE, D. S. J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. **Life Sci.** v. 3, p. 768, 2002.

HAIDER, T.; HUSAIN, Q. Calcium Alginate Entrapped Preparations of *Aspergillus oryzae*  $\beta$ -galactosidase: Its stability and Applications in the Hydrolysis of Lactose **International Journal of Biological Macromolecules**. p. 72-80, 2007.

HAIDER, T.; HUSAIN, Q. Hydrolysis of milk/whey lactose by  $\beta$  galactosidase: A comparative study of stirred batch process and packed bed reactor prepared with calcium alginate entrapped enzyme. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, v. 48, p. 576-580, 2009.

HARGER, C. ; SPRADA, D. ; HIRATSUKA, E. Amilase Fúngica. In: **Bioquímica das Fermentações**, 56 p., 1982.

HARJU, M.; KALLIOINEN, H.; TOSSAVAINEN, O. Lactose hydrolysis and other conversions in dairy products: Technological aspects (Review). **International Dairy Journal**, v. 22, p. 104-109, 2012.

HATZINIKOLAOU, D. G.; KATSIFAS, E.; MAMMA, D.; KARAGOUNI, A. D.; CHRISTAKOPOULOS, P.; KEKOS, D. Modeling of the Simultaneous Hydrolysis-Ultrafiltration whey Permeate by a Thermostable  $\beta$ -galactosidase from *Aspergillus oryzae*. **Biochemical Engineering Journal**. v. 24, p. 161-172, 2005.

HENLEY, J. P.; SADANA, A. Categorization of enzyme deactivations using a series-type mechanism. **Enzyme Microb. Technology**. v. 7, p. 50-60, 1985.

HOBMAN, P.G. Review of process and products for utilization of lactose in deproteinated milk serum. **Journal of Dairy Science**, v. 67, n.11, p. 2630-2653, 1984.

HOLSINGER, V.H. Lactose. In: WONG, P.N; JENNES,R.; KEENEY,M.; MARTH,E.H. **Fundamentals of Dairy Science**. New York, Van Nostrand Reinhold. 3 ed. pp. 279-342, 1988.

HOLSINGER, V.H. Physical and chemical properties of lactose. In: Lactose, water, salts and vitamins, London, **Advanced Dairy Chemistry**, v.3, p.1-38, 1997.

<http://www.3dchem.com/imagesofmolecules/Lactose.jpg>. Acessado em 26/10/2011

<http://sooro.com.br/> Acessado em 02/04/2012

INSUMOS. Intolerância à lactose e produtos lácteos com baixo teor de lactose. São Paulo: Editora Insumos. Disponível em: [www.insumos.com.br/aditivos\\_e\\_ingredientes/](http://www.insumos.com.br/aditivos_e_ingredientes/). Acesso em abril/2010.

JOHANSEN, A.G.; VEGARUD, G. E.; SKEIE,S. Seasonal and regional variation in the composition of whey from Norwegian Cheddar-tye and Dutch-type cheeses. **International Dairy Journal**, v. 12, p. 621-629, 2002.

JOSIC.D.; BUCHCHER, A.; JUNGBAUER, A. J.; CHROMATOG. B. **Anal. Technol. Biomed.** Life Sci., p. 191, 2001.

JURADO, E., CAMACHO, F., LUZÓN, G., VICARIA, J.M. A new Kinetic model proposed for enzymatic hydrolysis os lactose by  $\beta$ -galactosidase from *Kluyromyces fragilis*. **Enzyme and Microbial Technology** v.31, pp. 300-309, 2002.

KENNEDY, J.F., CABRAL, J.M.S. Enzyme immobilization. **Enzyme Technology**, 1987.

KIASAT, A.R. e SAYYAH, S. Immobilization of b-cyclodextrin onto Dowex resin as a stationary microvessel and phase transfer catalyst.**Catalysis Communications**, v. 11, p. 484-486, 2010.

KLEIN, M. P. **Imobilização de  $\beta$ -galactosidase para obtenção de produtos lácteos com baixo teor de lactose**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 91 p., 2010.

KOCIÁN, J. Lactose intolerance – minireview. **International Journal Biochemistry**, v. 20, n. 1, p.1-5, 1988.

KOSSEVA, M.R.; PANESAR, P.S.; KAUR, G.; KENNEDY, J.F. Use of immobilised biocatalysts in the processing of cheese whey. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 45, p. 437-447, 2009.

KRAJEWSKA, B. Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. **Enzyme and Microbial technology**, New York, v. 35, p. 126-134, 2004.

KISKA, J.; SWITKA, J.; KRUK, A.; SURAZYNSKI, A. Utilizacion de la  $\beta$ -D-galactosidase en la Elaboration de la Lecha Condensada Azucarada. **Le Lait**. v 527, p. 10-15, 1973.

KREMER, T.O. **Resinas de Troca Iônica**. São Paulo: Kurita do Brasil, 2007. Apostila.

LADERO, M., SANTOS, A. , GARCIA, J.L., GARCÍA-OCHOA. Activity over lactose and ONPG of a genetically engineered  $\beta$ -galactosidase from *Escherichia coli* in solution and immobilized: Kinetic modeling. Depto Ingenieria Química. Universidad Complutense. Depto Microbiologia. Centro de Investigaciones Biológicas. Madrid. Spain. **Enzyme and Microbial technology** 29 pp 181-193. April 2001.

LADERO, M.; SANTOS, A.; GARCIA-OCHOA, F. Kinetic modeling of lactose hydrolysis with an immobilized  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, n. 8, p. 583-592, 2000.

LETCA, D.; HEMMERLING.C.; WALTER, M.; WULLBRAND, D.; BUCHHOLZ, K. Immobilization of Recombinat Inulase II from a Genetically Modified *Escherichia coli* Strain. **Roumanian Society of Biological Sciences**. v. 9, p. 1879-1886, 2004.

LEITE, J.L.B. **Comércio Internacional de Lácteos**, 2. ed. rev. e ampl. – Juiz de Fora : Embrapa Gado de Leite, 350 p., 2009.

LEVENSPIEL, O. **Engenharia das reações químicas**. Tradução Sérgio Fuchs Calil, Pedro Maurício Büchler. São Paulo: Editora Edgard Blucher, 1974. v. 2, 481 p., 1974.

LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotecnología Industrial: Procesos Fermentativos e Enzimáticos**. São Paulo: Ed. Edgard Blucher Ltda, 2001. v. 3, 593 p., 2001.

LOMER, M. C. E.; PARKES, G. C.; SANDERSON, J. D. Review article: lactose intolerance in clinical practice: myths and realities. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**. London, v. 27, p. 93-103, 2008.

LONGO, G. **Influência da adição de lactase na produção de iogurtes**. 2006. 89f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

LÓPEZ-GALLEGU, L.; MATEO, C.; PALOMO, M. J.; FUENTES, M.; BETANCOR, L.; GRAZU, V.; PESSELA, C. C. B.; HIDALGO, A. ; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; GUISÁN, M. J. Glyoxyl agarose: A fully inert and hydrophilic support for immobilization and high stabilization of proteins. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 39, p. 274-280, 2005.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal Of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-275, 1951.

MAGALHÃES, K.T.; PEREIRA, M.A.; NICOLAU, A.; DRAGONE, G.; DOMINGUES, L.; TEIXEIRA, J.A.; SILVA, J.B.A.; SCHWAN, R.F. Production of fermented cheese whey-based beverage using kefir grains as starter culture: Evaluation of morphological and microbial variations. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 8843-8850, 2010.

MARIOTTI, M.P. Hidrólise da lactose de soro de leite por meio de  $\beta$ -galactosidase imobilizada. Tese de Mestrado. Instituto de Química. Universidade Estadual Paulista. 2000.

MARIOTTI, M.P.; YAMANAKA, H.; ARAUJO, A.R.; TREVISAN, H.C. Hydrolysis of Whey Lactose by Immobilized  $\beta$ -galactosidase. **Brazilian Archives of Biology and Technology an International Journal**. v.51 n.6, p.1233-1240, 2008.

MARKOGLOU, N.; WAINER, I. W. **Bioanalytical Separations**. New York: Elsevier Science, 2003. cap. 7.

MARQUEZ, L. D. S.; CABRAL, B. V.; CARDOSO, V. L.; RIBEIRO, E. J. Optimization of invertase immobilization by adsorption in ionic exchange resin for sucrose hydrolysis. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. v. 51, p. 86-92, 2008.

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

MAHONEY, R.R. Lactose: Enzymatic Modification. In: Lactose, water, salts and vitamins, London, **Advanced Dairy Chemistry**, v.3, pp.77-125, 1997.

MANAN, D. M. A.; KARIM, A. A.; KIT, W. K. Lactose content of modified enzymetreated 'dadih'. **Food Chemistry**, n. 65, p. 439-443, 1999.

MARIOTTO, R. J. Estágio de Docência – Enzimas, Universidade de São Carlos; 2006.

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

MARTINEK, K; KLIBANOVAM, GOLDMACHER, V. S.; BEREZIN, I.V. The principles of enzyme stabilization. I. Increase in thermostability of enzymes covalently bound to a complementary surface of a polymer support in a multi-point fashion. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 485, n. 1, p. 1-12, 1997.

MATEO, C.; ABIAN, O.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GUISÁN, J.M. Increase in conformational stability of enzymes on epoxy-activated supports by favouring additional



multipoint covalent attachment, **Enzyme And Microbial Technology**, v.26, p. 509-515, 2000.

MATEO, C.; ABIAN, O.; BERNEDO, M.; CUENCA, E.; FUENTES, M.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; PALOMO, J. M.; GRAZU, V.; PESSELA, B.C.C.; GIACOMINI, C.; IRAZOQUI, G.; VILLARINO, ANDREA.; OVSEJEVI, K.; BATISTA-VIERA, F.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; GUIBAN, J. M. Some special features of glyoxyl supports to immobilize proteins. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 37, p. 456-462, 2005.

MATEO, C.; PALOMO, J. M.; FUENTES, M.; BETANCOR, L.; GRAZU, V.; LÓPEZGALLEGU, L.; PESSELA, B.C.C.; HIDALGO, A.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; GUIBAN, J. M. Glyoxyl agarose: A fully inert and hydrophilic support for immobilization and high stabilization of proteins. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 39, p. 274-280, 2006.

MATEO, C.; PALOMO, J. M.; FERNANDEZ-LORETE, G.; GUIBAN, J. M.; FERNANDEZ-LORETE, R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 40, p. 1451-1463, 2007.

MATHUR, B.N.; PATEL, J.N.; SARMA, S.C. Application of Ultra-filtration for desproteinization of whey for lactose production. **Indian Journal of Dairy Science**, v. 34, p. 231-231, 1980.

MATTILA-SANDHOLM, T.; SAARELA, M. **Functional Dairy Products**. Woodhead Publishing, England, 392 p., 2003.

MESSING R. A. **Carriers-in Immobilized enzymes for industrial reactors**. Editora Messing, R. A. New York, 1975.

MIZUBUTI, I. Y. Soro de Leite: Composição, Processamento e Utilização na Alimentação. In: **Semana Ciências Agrárias**, 1994. v. 15, n. 1., 1994.

MORE, J.J.; WATSON, G.A. **The Levenberg-Marquardt algorithm: implementation and theory**. **Lecture Notes in Mathematics**. Springer Verlag, Berlin, v. 630, p. 105-116, 1977.

MORIWAKI, C.; MATIOLI, G. Influência de  $\beta$ -galactosidase na tecnologia do leite e na má digestão da lactose. **Arq.Ciênc. Saúde Unipar**, v. 4, n. 3, p. 283-290, set./dez. 2000

MORRISSEY, P. A, Lactose:chemical and physicochemical properties. In: FOX, P. F. **Developments in dairy chemistry**. London: Elsevier Applied SciencePublishers, 1985. v. 3. p. 1-34.

MOZHAEV, V.V.; MELIK-NUBAROV, N.S.; SERGEEVA, M.V. SIKRIS, V.; MARTINEK, K. Strategy for stabilizing enzymes I. Increasing stability of enzymes via their multipoint interaction with a support. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 3, n. 3, p. 179-187, 1990.

NAJAFPOUR, G. **Biochemical Engineering and Biotechnology**. Boston: Elsevier, 2007. 421p., 2007.

NERI D. F. M., BARLÃO V. M., CARNEIRO-DA-CUNHA M.G., CARVALHO L. B., TEIXEIRA J. A. Immobilization of  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* onto a polysiloxane–polyvinyl alcohol magnetic (mPOS–PVA) composite for lactose hydrolysis. **Catalysis Communications**. v. 9, p. 2334-2339, 2008.

NICKERSON, T. A. Lactose. In: WEBB, B.H., JOHNSON, A.H. and ALFORD, J.A. **Fundamentals of Dairy Chemistry**. Connecticut: The AVI Publishing Co., 1974. 2<sup>nd</sup> ed., p. 224-260, 273-324.

NICKLAS, T. A.; QU, H.; HUGHES, S. O; HE, M.; WAGNER, S. E.; FOUSHEE, H. R.; SHEWCHUK, R. M. Self-perceived lactose intolerance results in lower intakes of calcium and dairy foods and is associated with hypertension and diabetes in adults. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 94, p. 191-199, 2011.

NIJPELS, H. H.; BIRCH, C. G.; BLAKEBROUGH, H.; PARKER, K. J. **Enzymes and Food Processing**. **Appl. Sci.** v. 42, p. 89, 1981.

OBÓN, J.M.; CASTELLAR, M.R.; IBORRA, J.L.; MANJÓN, A. B-galactosidase immobilization for Milk lactose hydrolysis: A simple experimental and modelling study of batch and continuous reactors. **Biochemical education**, v. 28, n. 3, p. 164-168, 2000.

O'CONNELL, S.; WALSH, G. Physicochemical Characteristics of Commercial Lactases Relevant to their Application in the Alleviation of Lactose Intolerance. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v. 134, p. 179-191, 2006.

OLIVEIRA, C.C.M. de. **Produção de  $\beta$ -galactosidase por levedura recombinante – Desenvolvimento de um sistema de produção estável**. 2005. 100f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade do Minho, Braga, 2005.

OLIVEIRA, E.H.P. **Preparação de Membranas Microporosas para tratamento de efluentes da indústria de alimentos**. (Mestrado). Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 122p., 2000.

ORDÓÑEZ, J.A. **Tecnologia de Alimentos**. Vol. 2, Porto Alegre: Artmed, 2005, 279 p., 2005.

OOSTEROM M. W.; BELLE H. J. A.; RANTWIJL F.; SHELDON R.A. Immobilised  $\beta$ -galactosidases and their Use in Galactoside Synthesis. **Journal of Molecular CatalysisA: Chemical**. v. 134, p. 267-274, 1998.

OZDURAL, A.R., TANYOLAÇ, D., BOYACI, I.H., MUTLU, M., WEBB, C., Determination of apparent kinetic parameters for competitive product inhibition in packed-bed immobilized enzyme reactors. **Biochemical Engineering Journal** v.14, pp. 27-36, 2003.

ÖZDURAL, A. R.; ALKAN-SUNGUR, A.; BOYACI, I. H.; WEBB, C. Determination of Immobilized Enzyme Apparent Kinetic Parameters in Packed-bed Reactors: Presentation of a new Methodology. **Food and Bioproducts Processing**. v. 86, p. 104-108, 2008.

OTERO, C.; BALLESTEROS, A.; GUISÁN, J.M. Immobilization/stabilization of lipase from *Candida rugosa*. **Applied Biochemistry And Biotechnology**, v. 19, p. 163-175, 1991.

PACHECO, M.T.B.; DIAS, N.F.G.; BALDINI, V.L.S.; TANIKAWA, C.; SGARBIERI, V.C. Propriedades funcionais de hidrolisados obtidos a partir de concentrados protéicos de soro de leite. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 2, p. 333-338, 2005.

PANESAR, P. S.; KUMARI, S.; PANESAR, R. Potential Applications of Immobilized  $\beta$ -Galactosidase in Food Processing Industries. **Enzyme Research**, v.2010, 16 p., 2010.

PARK, H. Y.; KIM, H. J.; LEE, J. K.; KIM, D.; OH, D. K. Galactooligosaccharide production by a thermostable  $\beta$ -galactosidase from *Sulfolobus solfataricus*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Amsterdam, v. 24, n. 8, p. 1553-1558, 2008.

PEDROCHE J.; YUST M.M.; MATEO C.; FERNANDEZ-LAFUENTE R.; GIRON-CALLE J.; ALAIZ M. Effect of the support and experimental conditions in the intensity of the multipoint covalent attachment of proteins on glyoxyl-agarose supports. Correlation between enzyme–support linkages and thermal stability. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 1161-7, 2007.

PENNA, A.L.B.; ALMEIDA, K.E.; OLIVEIRA, M.N. Soro de leite: Importância Biológica, Comercial e Industrial – principais produtos. In: OLIVEIRA, M.N.R. (Ed.). Tecnologia de produtos lácteos funcionais. 1. Ed. São Paulo: Atheneu, 2009, p. 251-276.

PEREIRA FILHO, D.; FURLAN, S. A. Prevalência de intolerância à lactose em função da faixa etária e do sexo: experiência do Laboratório Dona Francisca, Joinville (SC). **Revista Saúde e Ambiente**. Joinville, v. 5, n. 1, p. 24-30, 2004.

PFLANZER, S.B.; CRUZ, A.G.; HATANAKA, C.L.; MAMEDE, P.L.; CADENA, R.; FARIA, J.A.F; SILVA, M.A.A.P. Perfil sensorial e aceitação de bebida láctea achocolatada. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.30, n. 2, p. 391-398, 2010.

PINTO, G.A. **Biorefinaria de soro de queijo: engenharia de bioprocessos e sistemas aplicada à transformação de um resíduo poluente em produtos com valor agregado**. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de São Carlos, 246 f., 2008.

PILKINGTON, P.H.; MARGARITIS, A.; MENSOUR, N. A. Mass Transfer Characteristics of Immobilized Cells Used in Fermentation Processes. **Criticals Reviews in Biotechnology**. v. 18, p. 237-255, 1998.

PORTACCIO, M.; STELLATO, S.; ROSSI, S.; BENCIVENGA, U.; ELDIN, M. S. S.; GAETA, F. S.; MITA, D. G. Galactose Competitive Inhibition of  $\beta$ -galactosidase (*Aspergillus oryzae*) Immobilized on Chitosan and Nylon supports. **Enzyme Microbial Technology**. v. 23, p. 101-106, 1998.

PORTO, L.M. **Estudo e Determinação das Melhores Condições Operacionais do Processo de Produção da Ricota**. Tese de Mestrado, Faculdade de Engenharia Química, UFMG, 2001.

PORTO, L.M.; SANTOS, R.C.; MIRANDA, T.L.S. Determinação das melhores condições operacionais do processo de produção de ricota. Boletim CEPPA, v. 23, n. 1, p. 173-182, 2005.

PRADELLA, G.C. Aplicação de enzimas na Tecnologia de Alimentos, In: AQUARONE, E.; BORZANI, W. SCHMIDELL, W e LIMA, U. A. **Biotecnologia Industrial**. São Paulo, Edgard Blücher Ltda, v. 4, p. 387-418, 2001.

PRETTO, F.M.; SILVEIRA, T. R.; MENEGAZ, V.; OLIVEIRA, J. Má absorção de lactose em crianças e adolescentes: diagnóstico através do teste de hidrogênio expirado com o leite de vaca como substrato. **Jornal de Pediatria**. Porto Alegre, v. 78, n. 3, p. 213-218, 2002.

REETZ, M.T.; ZONTA, A.; SIMPELKAMP, J. Efficient immobilization of lipases by entrapment in hydrophobic sol-gel material. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 49, p. 527-534, 1996.

REIS, J. S. **Resolução cinética enzimática de hidroxiésteres propargílicos: uma via de obtenção de moléculas bioativas**. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, 139 p., 2009.

RIANI, J.C. **Utilização de resinas de troca-iônica em efluentes de galvanoplastia**. Tese (Doutorado) – Escola Politécnica da Universidade de São Paulo. Departamento de Engenharia Metalúrgica e de Materiais. São Paulo, 121 p, 2008.

RIBEIRO E. J. **Estudo cinético da hidrólise de sacarose por invertase livre e imobilizada**. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) Campinas, SP, 1989, 203p.

ROSEVEAR, A. Immobilized Biocatalysts – a critical review. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology B – Biotechnology**, Oxford, v. 34, n. 3, p. 127-150, 1984.

ROSEVEAR, A.; KENNEDY, J. F.; CABRAL, J. M. S. **Immobilized enzymes and cells**. Philadelphia: IOP Publishing Ltda., 1987.

SAKO, T.; MATSUMOTO, K.; TANAKA, R..Recent progress on research and applications of non-digestible galactooligosaccharides. **International Dairy Journal**, vol. 9, no. 1, p. 69–80, 1999.

SALUM, T.F.C. **Produção e imobilização de lipase de *Burkholderia cepacia* lteb11 para a síntese de ésteres etílicos**. Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Paraná, 131 p., 2010.

SANTOS, R.; SIMIQUELI, A.P.R.; PASTORE, G.M. Produção de galactoligossacarídeo por *Scopulariopsis* sp. **Ciência e Tecnologia de Alimento**, v. 29, n. 3, p. 682-689, 2009.

SCOUTEN, W. H. **Methods in Enzymology**. Mosbach: K. ed., 1987. vol. 135, p.30-65.

SENS, R. F. **Avaliação da suplementação das enzimas xilanase e  $\beta$ -mananase em rações para perus**. Dissertação de Mestrado. Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, 108 p., 2009.

SGARBIERI, V.C. **Proteínas em alimentos protéicos: propriedades-degradações-modificações**. São Paulo: Varela; 517p. 1996.

SGARBIERI, V.C. Propriedades fisiológicas-funcionais das proteínas do soro de leite. **Revista de Nutrição**, Campinas, n. 17 (4), p. 397-409, 2004.

SHAH, N. P.; FEDORAK, R.N.; JELEN, P. J. Food consistency effects of quarg in lactose malabsorption. **International Dairy Journal**, n. 2, p. 257-269, 1992.

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

SHUKLA, T. P. B-galactosidase Technology: a Solution to the lactose problema. CRC, **Critical Review in Food Science and Nutrition**, v. 5, p. 325-356, 1975.

SILVA, P. H. F. Aspectos de Composição e Propriedades. **Química Nova na Escola -Leite**, n° 6, 1997.

SILVA, A. R. **Conversão multienzimática da sacarose em frutose e ácido glicônico usando reatores descontínuo e contínuo**. Dissertação de mestrado. Universidade de são Paulo, 2010.

SPARVOLI, A. C. **Má absorção de lactose do adulto em uma população nordestina**. Campinas: Ed. da Unicamp, 1989.

SPREER, E. **Lactologia Industrial**. Zaragoza, Espanha. Editora Acribia. 1975.

SHULER, M. L.; KARFI, F. **Bioprocess Engineering: basic concepts**; Prentice Hall; New Jersey; 479 p., 1992.

SMITHERS, G.W. Whey and whey proteins – From ‘gutter-to-gold’. **International Dairy Journal**, v. 18.P. 695-704, 2008.

SZCZODRAK, J. Hydrolysis of Lactose in whey Permeate by Immobilized  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. **Journal Of Molecular Catalysis B-Enzymatic**. v. 10, p. 631-637, 2000.

SZYMANSKA K.; BRYJAK J.; MROWIEC-BIALON J.; JARZEBSKI A. B. Application and Properties of Siliceous Mesostructured Cellular Foams as Enzymes Carriers to Obtain Efficient Biocatalysts. **Microporous and Mesoporous Materials**. v. 99, p. 167-175, 2007.

TANRISEVEN, A.S.; DOGAN, E. A novel method for the immobilization of  $\beta$ -galactosidase. **Process Biochemistry** v.38, pp 27-30, 2002.

TEIXEIRA, L.V.; FONSECA, L.M. Perfil físico-químico do soro de queijos mozzarella e minas-padrão produzidos em várias regiões do estado de Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, n. 1, p. 243-250, 2008.

THAMER, K.G.; PENNA, A.L.B. Caracterização de bebidas lácteas funcionais fermentadas por probióticos e acrescidas de prebiótico. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n.3, p. 589-595, 2006.

TOMOTANI, E. J.; VITOLO, M. Catalytic performance of invertase immobilized by adsorption on anionic exchange resin. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 1325-1331, 2006.

TORRES, A. N. Benefícios e malefícios do uso do leite de vaca na alimentação humana. **Nutrição Brasil**, v. 3, n. 4, jul./ago. 2004.

TREMARIN, A. **Condições operacionais na hidrólise enzimática da lactose em reator a membrana**. 2007. 104 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.

TRONCO, V. M. **Manual para inspeção da qualidade do leite**. Santa Maria: Ed. Da Universidade Federal de Santa Maria, 2003, 192 p.

UGGIONI, P. L.; FAGUNDES, R. L. M. Tratamento dietético da intolerância à lactose infantil: teor de lactose em alimentos. **Higiene de Alimentos**. São Paulo, v. 21, n. 140, p. 24-29, 2006.

USDA, United States Department of Agriculture. Dairy: World Markets and Trade. Julho, 2010. Disponível em [www.fas.usda.gov](http://www.fas.usda.gov). Acessado em 14/09/2011



USDEC, U. S. Dairy Export Council. Reference Manual for U. S. Whey and Lactose products. **Whey and Lactose: natural milk products**. Disponível em <www.fas.usda.gov>. Acesso em junho/2009.

VICENTE A. A. **Preparação de açúcar invertido por meio de invertase imobilizada em sílica**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) Araraquara, SP, 2000, 145p.

VIEIRA, C. D. **Imobilização da enzima  $\beta$ -galactosidase de *Kluyveromyces fragilis* em agarose e quitosana utilizando diferentes protocolos de ativação**. 2009. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos. p. 4, 8, 25.

VINHAL, E. F. **Hidrólise da Lactose no Leite por  $\beta$ -galactosidase de *Kluyveromyces fragilis***. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Engenharia Química - UFU. 2001.

VITOLO, M. **Reatores com enzimas imobilizadas**. In: LIMA, U. A., AQUARONE, E., BORZANI, W. and SCHMIDELL, W. Biotecnologia Industrial. São Paulo: Edgard Blücher LTDA. 2001.

WALSTRA, P.; JENNESS, R. **Dairy chemistry and physics**. Nova York: John Wiley & Sons, 1984.

WANG, D.I.C. **Fermentation and Enzyme Technology**. New York : Wiley, 1976

WILTCHEK, M.; MIRON, T. Oriented versus random protein immobilization. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 55, p. 67-70, 2003

WOODWARD, J. **Immobilised Cells and Enzymes: a practical approach**. Washington: Ed. by IRL Press Oxford. 1984. p. 3-17.

ZADOW, J.G. Lactose – Properties and Uses. **Journal of Dairy Science**, v. 67, n.11, p. 2654-2679, 1984.

ZANIN, G. M.; MORAES, F. F. **Enzimas como Agentes Biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Ed. Legis Summa, 2004. cap. 4, p. 35-85.

ZANIN, G. M. **Sacarificação de amido em reator de leito fluidizado com enzima amiloglicosidase imobilizada**. Tese Doutorado em Engenharia de alimentos. Faculdade de Engenharia de alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 454 p., 1989.

ZIMMER, T. R. **Influência da carga orgânica e do tempo de enchimento sobre o desempenho do reator anaeróbio em batelada seqüencial com biomassa granulada tratando soro de queijo**. 2006. 160f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Hidráulica e Saneamento) - Escola de Engenharia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2006.

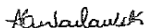
## ANEXO

### ANEXO A

	<b>CERTIFICADO DE ANÁLISE</b> Laboratório de Controle de Qualidade Concentrado Ind. de Produtos Lácteos Ltda.
---	---

Produto: Permeado de Soro de Leite em Pó	Data: 11/11/2011
AMOSTRA	

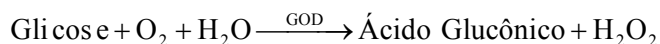
PARÂMETROS	ESPECIFICAÇÃO	VALORES ANÁLISE
Lote		011
Quantidade kg		25 unidades
Data de fabricação		04/10/11
Validade	01 ano após a data de fabricação	04/10/12
Aspecto	Pó uniforme sem grumos	Característicos, conforme especificação
Cor	Branco a amarelado.	Branco a amarelado, conforme especificação
Sabor/ Odor	Levemente lácteos	Característicos, conforme especificação
Umidade (%)	Máximo 4,0	1,05 /
Acidez (% ácido láctico)	Máximo 2,0	1,93
Gordura (%)	Máximo 1,5	0,0%
pH	6,0 – 6,7	6,25
Proteínas (%)	Mínimo 3,0	1,42 /
Cinzas (sais minerais %)	Máximo 6,0	4,56 /
Lactose (%)	Mínimo 80,0	92,97 /
Aeróbios Mesófilos (UFC/g)	Máximo 5 x 10 <sup>4</sup>	<10 <sup>2</sup>
St. Aureus coagulase positivo (UFC/g)	Máximo 100	<10 <sup>1</sup>
Coliformes totais (UFC/g)	Máximo 100	<10 <sup>1</sup>
Coliformes fecais (UFC/g)	Máximo 10	<10 <sup>1</sup>
Bolores e leveduras (UFC/g)	Máximo 50	2,0X10 <sup>1</sup>
Salmonela (valor garantido)	Ausência	Ausente

  
Ana Claudia Wacławik  
Garantia da Qualidade

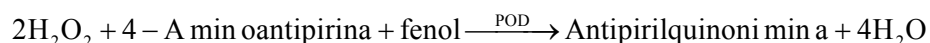
## ANEXO B

### DETERMINAÇÃO DE GLICOSE

A glicose-oxidase catalisa a oxidação da glicose de acordo com a seguinte reação:



O peróxido de hidrogênio formado reage com 4-aminoantipirina e fenol, sob ação catalisadora da peroxidase, através de uma reação oxidativa de acoplamento formando uma antipirilquinonimina vermelha cuja intensidade de cor é proporcional à concentração da glicose na amostra.



O kit GLICOSE PAP Liquiform contém 1000 mL de Reagente 1 e 5 mL de Padrão. O Reagente 1 é apresentado pronto para uso utilizando metodologia enzimática de grande especificidade analítica, de simples e fácil aplicação em laboratório.

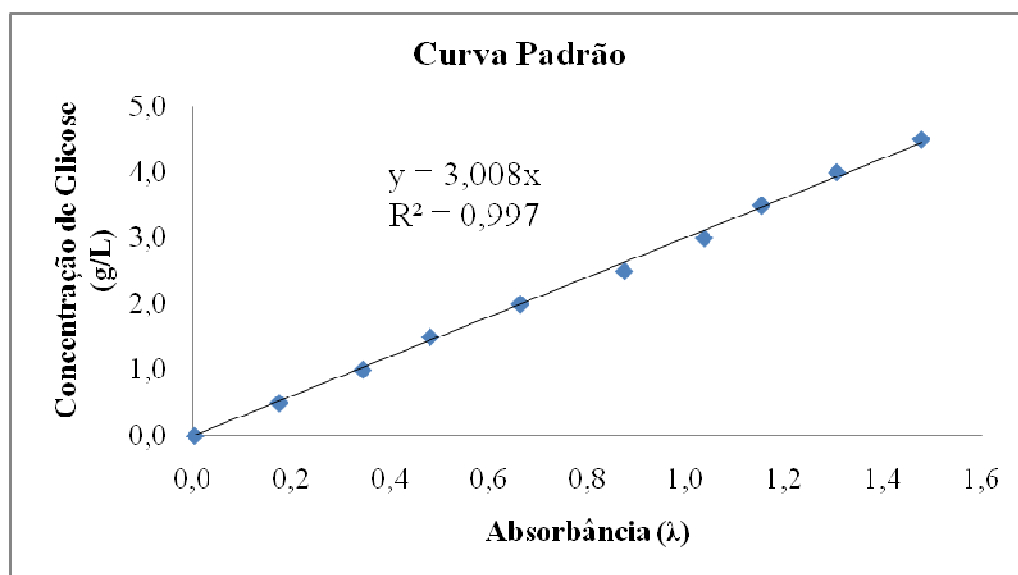
O método pode ser utilizado em técnica manual e é facilmente aplicável em analisadores semi-automáticos e automáticos capazes de medir com exatidão a absorvância entre 420 e 520 nm.

Para determinação de teor de glicose em uma amostra, o primeiro passo foi à determinação da curva padrão, de absorvância em função das concentrações de glicose. Para isso foram utilizados tubos de ensaios contendo 2 mL do Reagente 1, aos quais foram adicionados 20 µL de solução de glicose, na faixa de concentração de 0,0 a 4,5 g/L, com intervalos de 0,5 g/L, os tubos de ensaio foram agitados vigorosamente e incubados em banho-maria a 37 +/- 2°C durante 10 minutos. Após esse tempo, eram lidas as absorvâncias a 505 nm em espectrofotômetro, considerando como branco o Reagente 1. Com os valores de absorvância em função da concentração de glicose foi obtida a curva padrão, considerando o intervalo de concentração adotado.

Para uma amostra de concentração desconhecida de glicose seguia-se o procedimento supracitado, determinando-se a sua absorvância, e a partir da curva padrão, a concentração de glicose.

Os dados utilizados para determinação da curva padrão, bem como o gráfico e a equação da curva padrão obtida são apresentados abaixo.

Curva Padrão	
Absorbância ( $\lambda$ )	Concentração Glicose (g/L)
0,0020	0,0
0,1733	0,5
0,3432	1,0
0,4801	1,5
0,6626	2,0
0,8739	2,5
1,0363	3,0
1,1523	3,5
1,3053	4,0
1,4769	4,5



## **ANEXO C**

### **DOSAGEM DE PROTEÍNA**

A dosagem de proteína foi realizada através do Método de Lowry (1951), constituídos das soluções A, B e AB.

Reativo A: 2 g de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  seco mais 0,02 g de tartarato duplo de sódio e potássio em 100 mL de  $\text{NaOH}$  0,1 M

Reativo B: 0,5 g de  $\text{CuSO}_4$  mais 2 gotas de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado em 100 mL de água destilada.

Solução AB: 50 mL de reativo A e 1 mL de reativo B, preparado imediatamente antes da dosagem.

Reativo de Folin: preparava uma solução 1 N e era armazenado ao abrigo da luz.

Solução padrão de soro de albumina bovina (BSA) 100 mg/L. Adicionava-se cuidadosamente 100 mg de BSA em 1000 mL para evitar a formação de bolhas. Esta solução era conservada sob refrigeração.

Para a dosagem de proteína fazia-se a diluição das amostras para que a absorbância situasse na faixa de 0,0 a 1,0. Amostras de 1,0 mL contendo proteína a ser dosada eram adicionadas a um frasco tipo penicilina cor âmbar no qual eram acrescentados 3 mL de solução AB, cobertos com parafilm, homogeneizados, protegidos da luz e mantidos desta forma por 10 minutos. Após este tempo adicionava-se 0,3 mL de reativo Folin 1 N e deixava por mais 30 minutos ao abrigo da luz. Ao final efetuava a medida da absorbância a 760 nm em espectrofotômetro, utilizando cubetas de vidro.

A leitura da absorbância era convertida em concentração de proteína pela curva de calibração realizada anteriormente pelo mesmo procedimento, com medidas de absorbância em relação a concentrações de BSA na faixa de 0 a 100 mg/mL, que resultou em uma equação linear.

Os dados utilizados para determinação da curva padrão, bem como o gráfico e a equação da curva padrão obtida são apresentados abaixo.

Curva Padrão	
Absorbância (λ)	ConcentraçãoBSA (mg/L)
0,0790	10,0
0,1310	20,0
0,1620	30,0
0,2085	40,0
0,2275	50,0
0,2775	60,0
0,2975	70,0
0,3340	80,0
0,3915	100,0

