



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

**Síntese e imobilização em resina de troca
iônica de β -galactosidase de *Kluyveromyces
marxianus***

Carla Cristina de Sousa

UBERLÂNDIA-MG

2018



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**Síntese e imobilização em resina de troca
iônica de β -galactosidase de *Kluyveromyces
marxianus***

Carla Cristina de Sousa

Orientador: Eloízio Júlio Ribeiro

Coorientadora: Larissa Nayhara Soares Santana Falleiros

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

UBERLÂNDIA-MG

2018

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

S725s
2018 Sousa, Carla Cristina de, 1993-
 Síntese e imobilização em resina de troca iônica de β -galactosidase
de *Kluyveromyces marxianus* / Carla Cristina de Sousa. - 2018.
 143 f. : il.

 Orientador: Eloízio Júlio Ribeiro.
 Coorientadora: Larissa Nayhara Soares Santana Falleiros.
 Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.
 Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2018.1141>
 Inclui bibliografia.

 1. Engenharia química - Teses. 2. *Kluyveromyces marxianus* - Teses.
3. Lactose - Teses. 4. Hidrólise - Teses. I. Ribeiro, Eloízio Júlio, 1957-
II. Falleiros, Larissa Nayhara Soares Santana. III. Universidade Federal
de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. IV.
Título.

CDU: 66.0

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE CARLA CRISTINA DE SOUSA 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 19 DE FEVEREIRO DE 2018.

BANCA EXAMINADORA:



Prof. Dr. Eloízio Júlio Ribeiro
Orientador PPGEQ/UFU



Profa. Dra. Larissa Nayhara Soares Santana Falleiros
Coorientadora PPGEQ/UFU



Profa. Dra. Mirjam Maria de Resende
PPGEQ/UFU



Prof. Dr. Ubirajara Coutinho Filho
PPGEQ/UFU



Profa. Dra. Carolina Merheb Dini
ICTE/UFTM

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, aos meus pais Gislene e Carlos, meu irmão Rafael, meus avós João e Petronília, tia Gislaine, minhas primas Aline e Camila e ao meu namorado Júnior.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, os meus sinceros agradecimentos a Deus, por ser o meu guia, minha força e minha luz, sem Ele a caminhada jamais seria concluída. Obrigada por me conceder saúde e força para superar os obstáculos existentes durante minha jornada.

Agradeço aos meus pais, Gislene e Carlos, aqueles que não mediram esforços para a realização do meu sonho, acreditaram no meu potencial e sempre me apoiaram em todas as decisões, por todos os ensinamentos, amor, carinho e companheirismo, muito obrigada!

Aos meus avós João e Petronília, joias raras da minha vida, por todo amor, incentivo e exemplo de vida!

Ao meu irmão Rafael, minha tia/madrinha Gislaine e as minhas primas Aline e Camila, por toda ajuda e motivação durante o trabalho. De uma forma muito carinhosa gostaria de agradecer todos os meus familiares que participaram dessa caminhada comigo e sempre foram incentivadores.

Ao meu amado Júnior, por toda ajuda, amor, carinho e companheirismo durante essa etapa.

A dona Deusdete, por toda motivação, ajuda e orações.

Em especial meus agradecimentos aos meus orientadores Larissa e Eloízio, muito obrigada pela possibilidade de desenvolvimento deste trabalho, toda paciência, todos os ensinamentos, conselhos e ajuda em tudo.

Agradeço à professora Míriam que participou efetivamente do trabalho, sempre disposta a ajudar e resolvendo os diversos problemas, muito obrigada!

Agradeço os técnicos e professores da FEQUI, por toda ajuda e paciência.

Aos meus queridos alunos de iniciação científica Débora, Gustavo, Letícia Araujo e Letícia Cristina por toda ajuda, dedicação e compromisso na execução do trabalho.

De forma especial meus agradecimentos aos meus amigos e colegas do NUCBIO, por todas as experiências compartilhadas, toda ajuda, diversão e gordices!

Agradeço também aos meus amigos que ingressaram comigo no mestrado, dividiram comigo todas as experiências foram muitas vezes minha família em Uberlândia, Ana, Ana Clara, Anderson, Erica, Flavia, Rodolfo e Stelinha muito obrigada por tudo!

As minhas amorinhas Alice, Nara e Marina, agradeço pela acolhida em Uberlândia, por toda amizade, força e carinho!

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

À CAPES pelo o apoio financeiro concedido.

À banca examinadora, por terem aceitado o convite e por ajudarem a engrandecer o meu trabalho.

Enfim, agradeço a todos que de forma direta ou indireta participaram para que a realização deste trabalho fosse possível. *Minha eterna e sincera gratidão!*

*“Nada é pequeno se feito com amor.”
Santa Terezinha do Menino Jesus*

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	iv
LISTA DE SÍMBOLOS	vi
RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO	4
1.1 OBJETIVOS	5
1.1.1 Objetivos específicos	5
CAPÍTULO 2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	7
2.1 LEITE, SORO DE LEITE E PERMEADO DE SORO DE LEITE	7
2.1.1 Leite	7
2.1.2 Soro Lácteo	9
2.1.3 Permeado de soro lácteo	11
2.2 LACTOSE	13
2.2.1 Intolerância a lactose	15
2.2.2 Hidrólise da Lactose	17
2.3 ENZIMAS	19
2.3.1 Enzima β -galactosidase	20
2.3.2 Principais fontes de β -galactosidase	21
2.4 LEVEDURA <i>Kluyveromyces marxianus</i>	24
2.5 EXTRAÇÃO, CONCENTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO	25
2.6 IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS	27
2.7 MÉTODOS DE IMOBILIZAÇÃO	30
2.7.1 Imobilização por ligações a suportes	31
2.7.2 Imobilização por retenção física	34
2.7.3 Imobilização por ligação cruzada	35

2.8 SUPORTES PARA IMOBILIZAÇÃO	36
2.8.1 Imobilização em resinas	37
2.9 IMOBILIZAÇÃO DE β -GALACTOSIDASE	39
CAPÍTULO 3 – MATERIAL E MÉTODOS.....	42
3.1 MATERIAL	42
3.1.1 Microrganismo	42
3.1.2 Manutenção da Cultura	43
3.1.3 Substratos	43
3.1.4 Inóculo.....	44
3.1.5 Meio de cultura para fermentação	45
3.1.6 Suporte para imobilização	45
3.1.7 Unidade Experimental.....	46
3.2 METODOLOGIA.....	50
3.2.1 Fermentação da <i>K.marxianus</i> para produção da β -galactosidade	50
3.2.2 Extração da enzima	50
3.2.3 Determinação da atividade enzimática.....	51
3.2.4 Determinação da concentração celular.....	51
3.2.5 Determinação das concentrações de lactose e etanol	52
3.3 CARACTERIZAÇÃO DA β -GALACTOSIDASE SOLÚVEL	52
3.3.1 Estudo da estabilidade térmica da β -galactosidase solúvel.....	52
3.3.2 Estudo da estabilidade da β -galactosidase solúvel em relação ao pH.....	53
3.3.3 Estabilidade ao armazenamento da β -galactosidase solúvel	54
3.4 IMOBILIZAÇÃO DA β -GALACTOSIDASE.....	54
3.4.1 Ativação do Suporte	54
3.4.2 Imobilização	54
3.4.3 Atividade recuperada da imobilização da β -galactosidase.....	55
3.5 TESTES PRELIMINARES DE IMOBILIZAÇÃO DA β -GALACTOSIDASE.....	55

3.5.1 Avaliação da estabilidade da β -galactosidase solúvel nas condições de imobilização.....	56
3.5.2 Avaliação do tempo de imobilização da β -galactosidase.....	56
3.5.3 Avaliação do volume de extrato enzimático para imobilização da β -galactosidase.....	56
3.5.4 Avaliação da atividade ofertada da enzima para imobilização da β -galactosidase.....	56
3.5.5 Avaliação da imobilização da enzima β -galactosidase liofilizada.....	56
3.6 OTIMIZAÇÃO DA IMOBILIZAÇÃO DA β -GALACTOSIDASE DE <i>Kluyveromyces marxianus</i>	57
3.7 IMOBILIZAÇÃO COM A ENZIMA COMERCIAL.....	59
3.8 IMOBILIZAÇÃO EM SÉRIE DA ENZIMA β -GALACTOSIDASE.....	59
3.9 TESTES PRELIMINARES DA RETICULAÇÃO COM GLUTARALDEÍDO.....	60
CAPÍTULO 4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
4.1 CINÉTICA DE FERMENTAÇÃO PARA PRODUÇÃO DA β -GALACTOSIDASE A PARTIR DE <i>Kluyveromyces marxianus</i> ATCC 46537.....	61
4.3 CARACTERIZAÇÃO DA β -GALACTOSIDASE SOLÚVEL	65
4.3.1 Estudo da estabilidade térmica da β -galactosidase solúvel.....	65
4.3.2 Estudo da estabilidade da β -galactosidase solúvel ao pH	72
4.2.3 Estabilidade ao armazenamento da β -galactosidase solúvel	74
4.4 TESTES PRELIMINARES DE IMOBILIZAÇÃO DA β -GALACTOSIDASE.....	77
4.4.1 Avaliação da estabilidade da β -galactosidase solúvel nas condições de imobilização.....	77
4.4.2 Avaliação do tempo de imobilização da β -galactosidase.....	78
4.4.3 Avaliação do volume de extrato enzimático na imobilização da β -galactosidase.....	81
4.4.4 Avaliação da atividade ofertada de enzima na imobilização da β -galactosidase.....	82
4.4.5 Avaliação da imobilização com a enzima β -galactosidase liofilizada	85

4.5 OTIMIZAÇÃO DA IMOBILIZAÇÃO DA β -GALACTOSIDASE DE <i>Kluyveromyces marxianus</i>	88
4.5 IMOBILIZAÇÃO COM A ENZIMA COMERCIAL.....	96
4.6 IMOBILIZAÇÃO EM SÉRIE DA ENZIMA β -GALACTOSIDASE.....	97
4.7 TESTES PRELIMINARES DA RETICULAÇÃO COM GLUTARALDEÍDO.....	99
CAPÍTULO 5 – CONCLUSÕES	101
CAPÍTULO 6 – SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	103
CAPÍTULO 7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	104
ANEXO.....	123
APÊNDICE	125

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 - Mecanismo proposto para formação de oligossacarídeos (GAL: Galactose, E: Enzima, LAC: Lactose, GLC: Glicose, ROH: Radical hidroxila).....	19
Figura 2.2 - Classificação dos métodos de ruptura celular.....	26
Figura 2.3 - Métodos para imobilização de enzimas.....	31
Figura 2.4 - Efeito da imobilização na estabilidade da enzima.....	33
Figura 2.5 - Mecanismo de reação de <i>cross-linking</i> com glutaraldeído.....	35
Figura 3.1 - Fluxograma do desenvolvimento da metodologia experimental.....	42
Figura 3.2 - Resina Duolite [®] A-568.....	45
Figura 3.3 - Reator Cônico de Bancada utilizado na preparação do inóculo.....	47
Figura 3.4 - Fermentador Biostat B.....	47
Figura 3.5 - Processador Ultrassônico.....	48
Figura 3.6 - Unidade Experimental para determinação da atividade enzimática para enzima solúvel.....	49
Figura 3.7 - Unidade Experimental para determinação da atividade enzimática da enzima imobilizada.....	49
Figura 4.1 - Perfil de atividade enzimática durante a fermentação nas condições utilizadas (300 rpm e 1 vvm) para produção de β -galactosidase de <i>K. marxianus</i>	62
Figura 4.2 - Variação do pH durante a fermentação nas condições utilizadas (300 rpm e 1 vvm) para produção de β -galactosidase de <i>K. marxianus</i>	62
Figura 4.3 - Perfil de concentração de lactose, etanol e biomassa durante a fermentação cinética nas condições utilizadas (300 rpm e 1 vvm) para produção de β -galactosidase de <i>K. marxianus</i>	63
Figura 4.4 - Levedura <i>Kluyveromyces marxianus</i> antes da ruptura A) 1,75 K X e B) 10.000 K X.....	64
Figura 4.5 - Levedura <i>Kluyveromyces marxianus</i> após a ruptura pelo processador ultrassônico A) 1,50 K X e B) 10.00 K X.....	64
Figura 4.6 - Perfis de inativação térmica para β -galactosidase imobilizada em 30 °C;.....35°C; 40 °C; 50° C.....	65
Figura 4.7 - Perfil de inativação térmica a 30°C e pH 7,3 (tampão fosfato de sódio 0,2 M) para imobilização de β -galactosidase. Ajuste de modelo matemático aos dados experimentais:	

Equação 3.1=modelo de desativação térmica de primeira ordem; Equação 3.2=modelo de desativação térmica com um estágio.....	67
Figura 4.8 - Perfil de inativação térmica a 35°C e pH 7,3 (tampão fosfato de sódio 0,2 M) para imobilização de β -galactosidase. Ajuste de modelo matemático aos dados experimentais: Equação 3.1=modelo de desativação térmica de primeira ordem; Equação 3.2=modelo de desativação térmica com um estágio.....	68
Figura 4.9 - Perfil de inativação térmica a 40°C e pH 7,3 (tampão fosfato de sódio 0,2 M) para imobilização de β -galactosidase. Ajuste de modelo matemático aos dados experimentais: Equação 3.1=modelo de desativação térmica de primeira ordem; Equação 3.2=modelo de desativação térmica com um estágio.....	69
Figura 4.10 - Perfil de inativação térmica a 50°C e pH 7,3 (tampão fosfato de sódio 0,2 M) para imobilização de β -galactosidase. Ajuste de modelo matemático aos dados experimentais: Equação 3.1=modelo de desativação térmica de primeira ordem; Equação 3.2=modelo de desativação térmica com um estágio.	70
Figura 4.11 - Ajuste ao modelo de Arrhenius aos dados experimentais (valores de k_d).....	71
Figura 4.12 - Influência do pH na estabilidade da β -galactosidase solúvel em 30 °C e em tampão fosfato de sódio em pH 6,0; 6,5; 7,0; 7,3; 7,5 e 8,0.	73
Figura 4.13 - Estabilidade ao armazenamento da β -galactosidase solúvel não liofilizada armazenada à 10 °C e liofilizada mantida à -15 °C	75
Figura 4.14 - Resina Duolite [®] A-568 ativada com solução de ácido clorídrico 1 M e hidróxido de sódio 1 M antes da imobilização da β -galactosidase a A) 30 X e B) 300 X.....	77
Figura 4.15 - Estabilidade da β -galactosidase solúvel pH 7,3 nas condições de imobilização de 150 rpm e 25 °C	77
Figura 4.16 - Avaliação do tempo de imobilização ofertando 10 mL de extrato enzimático em 0,5 g de resina a 150 rpm e 25 °C	79
Figura 4.17 - Avaliação do tempo de imobilização de 0 a 180 minutos ofertando 10 mL de extrato enzimático em 0,5 g de resina a 150 rpm e 25 °C	80
Figura 4.18 – Influência do volume ofertado na imobilização da β -galactosidase em 0,5 g de resina em 150 rpm e 25 °C.....	81
Figura 4.19 - Influência da atividade enzimática ofertada na imobilização da β -galactosidase em 0,5 g de resina em 150 rpm e 25°C	83
Figura 4.20 - Extrato enzimático liofilizado.....	85
Figura 4.21 - Influência do volume ofertado de enzima liofilizada na imobilização da β -galactosidase em 0,5 g de resina a 150 rpm e 25 °C.....	86

Figura 4.22 - Reavaliação do tempo de imobilização do extrato enzimático liofilizado em 0,5 g de resina, 150 rpm e 25 °C.....	88
Figura 4.23 - Distribuição de resíduos relativos à imobilização de β -galactosidase.....	92
Figura 4.24 - Valores preditos em relação aos valores observados à imobilização de β -galactosidase	93
Figura 4.25 - Valores dos resíduos em relação ao valor normal esperado para imobilização de β -galactosidase.....	93
Figura 4.26 - Curvas de contorno da influência do pH, concentração do tampão e atividade ofertada na atividade recuperada da imobilização da β -galactosidase.	94

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 - Composição média do leite de vaca	8
Tabela 2.2 - Composição e pH do soro doce e soro ácido.....	10
Tabela 2.3 - Propriedades de β -galactosidases de diferentes fontes microbianas	23
Tabela 2.4 - Diferentes microrganismos estudados para produção de β -galactosidase	24
Tabela 3.1 - Composição do Meio de Manutenção YMA.....	43
Tabela 3.2 - Composição do Tampão Lático.....	44
Tabela 3.3 - Composição do meio inóculo para cultivo da <i>K. marxianus</i>	44
Tabela 3.4 - Composição do meio de cultura para fermentação da <i>K. marxianus</i>	45
Tabela 3.5 - Características da Resina Duolite [®] A-568 (Rohm Hass)	46
Tabela 3.6 - Valores reais e codificados utilizados no Planejamento Composto Central	58
Tabela 3.7 - Matriz do PCC com os valores codificados e originais das variáveis.....	59
Tabela 4.1 - Ajuste dos dados experimentais aos modelos de desativação térmica de primeira ordem e em um estágio para β -galactosidase solúvel	66
Tabela 4.2 - Valores de k_d e tempos de meia-vida calculados pelo modelo de primeira ordem de desativação térmica	71
Tabela 4.3 - Padronização da atividade ofertada de enzima em relação ao volume ofertado na imobilização.....	82
Tabela 4.4 - Resultados obtidos das diferentes atividades enzimáticas ofertadas na imobilização da β -galactosidase em 0,5 g de resina	84
Tabela 4.5 - Comparação entre a imobilização da enzima não liofilizada e liofilizada com atividade ofertada de enzima 27 U nas condições de 0,5 g de resina, 150 rpm e 25 °C....	87
Tabela 4.6 - Matriz com os resultados obtidos da atividade recuperada do processo de imobilização da β -galactosidase de <i>K. marxianus</i>	89
Tabela 4.7 - Resultado da regressão múltipla aplicada ao PCC sobre o resultado da atividade recuperada da imobilização da β -galactosidase	90
Tabela 4.8 - Resultado da regressão múltipla aplicada ao PCC sobre o resultado da atividade recuperada da imobilização da β -galactosidase com parâmetros significativos.....	91
Tabela 4.9 - ANOVA para resposta da atividade recuperada da imobilização de β -galactosidase	92
Tabela 4.10 - Atividade recuperada obtida no experimento de validação do PCC.....	96
Tabela 4.11 - Resultados referentes à imobilização da enzima comercial Lactozyme [®]	96

Tabela 4.12 - Comparação entre a imobilização da enzima β -galactosidase produzida e a β -galactosidase comercial Lactozyme [®] com atividade ofertada inicial de 27 U; pH 7,3; 150 rpm e 25 °C na imobilização.....	97
Tabela 4.13 - Resultados da pré-purificação da enzima β -galactosidase	98
Tabela 4.14 - Avaliação da reticulação com glutaraldeído em diferentes concentrações	99

LISTA DE SÍMBOLOS

β	Beta - forma anomérica da enzima β -galactosidase
T	Temperatura absoluta (K)
A	Atividade enzimática
A_0	Atividade enzimática inicial
A/A_0	Atividade enzimática em relação à inicial
$\alpha_1 = E_1/E$	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
$t_{1/2}$	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_{mod})
U	Atividade enzimática (μmol de glicose por minuto)

RESUMO

A β -galactosidase é uma hidrolase que catalisa a reação de hidrólise da lactose. Essa enzima tem se destacado cada vez mais no âmbito industrial, apresenta grande potencial para aplicação na indústria de laticínios, pela sua ação é possível elaborar produtos isentos de lactose, voltados para intolerantes, além de aumentar a digestibilidade de lácteos e melhorar as características dos mesmos. Além disso, a β -galactosidase atua na produção de galacto-oligosacarídeos, que possuem efeitos prebióticos e ajudam na manutenção da flora intestinal. A lactose, principal carboidrato do leite, está presente em alta quantidade no soro de leite, designado como subproduto da indústria de laticínios, nesse sentido a β -galactosidase apresenta potencial significativo para hidrólise da lactose do soro de leite com possibilidade de desenvolvimentos de novos produtos e tecnologias. A enzima β -galactosidase têm sido imobilizada com intuito de expandir e melhorar sua aplicação nos processos. Assim, vários métodos de imobilização vêm sendo aplicados, um deles é a adsorção física, método simples que envolve apenas ligações fracas. Dentre os suportes utilizados as resinas de troca iônica apresentam grande potencial. Neste trabalho a β -galactosidase foi produzida a partir da levedura *Kluyveromyces marxianus* e imobilizada em resina de troca iônica Duolite[®] A-568. A produção foi realizada por fermentação submersa, utilizando como fonte de carbono a lactose presente no permeado do soro de leite. Em seguida, a enzima foi caracterizada quanto sua estabilidade térmica, ao pH e ao armazenamento. Após a caracterização da enzima livre, esta foi imobilizada em resina Duolite[®] A-568. Realizaram-se testes preliminares variando tempo, concentração de enzima e utilização de enzima liofilizada na imobilização. Na sequência foi realizado uma otimização das condições por meio de um Planejamento Composto Central com as variáveis pH, concentração do tampão e atividade ofertada na imobilização. Para todas as imobilizações definiu-se a atividade recuperada. Foram realizados testes de reticulação com glutaraldeído em diferentes concentrações. A enzima também passou por um processo com duas imobilizações, visando aumentar a atividade recuperada. Como resultados obtidos, a enzima livre apresentou maior estabilidade térmica a 30 °C e estabilidade ao pH 7,3, além de reter 80% da atividade inicial durante sete semanas de armazenamento sob refrigeração, tanto em sua forma solúvel como liofilizada. Os testes preliminares de imobilização definiram a atividade ofertada como 27 U e o tempo de uma hora de imobilização, a atividade recuperada da imobilização com a enzima não liofilizada e liofilizada não apresentou diferenças. Na otimização as faixas ótimas obtidas no planejamento foram de 6,9 a 7,3 para o pH, 0,4 a 0,8 M para concentração do tampão e 24 a 31 U para atividade ofertada. Os testes de reticulação mostraram que o aumento da concentração da solução de glutaraldeído implicou em uma redução da atividade do biocatalisador imobilizado. A imobilização em série foi importante para aumentar a atividade do biocatalisador imobilizado. De forma geral a enzima produzida se apresentou eficiente para imobilização em resina de troca iônica Duolite[®] A-568, levando em consideração que mais variáveis devem ser otimizadas para melhora da imobilização.

Palavras-chave: β -galactosidase; *Kluyveromyces marxianus*; hidrólise da lactose; Duolite A-568; adsorção.

ABSTRACT

β -galactosidase is a hydrolase that catalyzes the hydrolysis reaction of lactose. This enzyme has been increasingly highlighted in the industrial field, presents great potential for application in the dairy industry, by its action it is possible to produce lactose-free products, aimed at intolerants, in addition to increasing the digestibility of dairy products and improving their characteristics. In addition, β -galactosidase acts in the production of galacto-oligosaccharides, which have prebiotic effects and help in maintaining the intestinal flora. Lactose, the main carbohydrate in milk, is present in high amounts in whey, designated as a by-product of the dairy industry, in which β -galactosidase presents significant potential for hydrolysis of whey lactose with the possibility of new product developments and technologies. The β -galactosidase enzyme has been immobilized in order to expand and improve its application in the processes. Thus, several methods of immobilization have been applied, one of them is the physical adsorption, simple method involving only weak links. Among the substrates used ion exchange resins have great potential. In this work β -galactosidase was produced from yeast *Kluyveromyces marxianus* and immobilized on Duolite[®] A-568 ion exchange resin. The production was carried out by submerged fermentation, using lactose present in the permeate of the whey as the carbon source. The enzyme was then characterized as to its thermal stability, pH and storage. After characterization of the free enzyme, it was immobilized on Duolite[®] A-568 resin. Preliminary tests were performed varying time, enzyme concentration and use of lyophilized enzyme in the immobilization. In the sequence an optimization of the conditions was carried out by means of a Central Composite Planning with the variables pH, buffer concentration and activity offered in the immobilization. For all immobilizations the recovered activity was defined. Glutaraldehyde crosslinking tests were performed at different concentrations. The enzyme also underwent a process with two immobilizations, aiming to increase the recovered activity. As results obtained, the free enzyme presented greater thermal stability at 30 ° C and stability at pH 7.3, besides retaining 80% of the initial activity during seven weeks of storage under refrigeration, both in its soluble and lyophilized form. Preliminary immobilization tests defined the activity offered as 27 U and the one-hour immobilization time, the activity recovered from immobilization with the non-lyophilized and lyophilized enzyme did not present differences. In the optimization, the optimum ranges obtained in the planning were 6.9 to 7.3 for the pH, 0.4 to 0.8 M for the buffer concentration and 24 to 31 U for the offered activity. Crosslinking tests showed that increasing the concentration of the glutaraldehyde solution implied a reduction in the activity of the immobilized biocatalyst. Serial immobilization was important to increase the activity of the immobilized biocatalyst. In general, the enzyme produced was efficient for immobilization in Duolite[®] A-568 ion exchange resin, taking into account that more variables should be optimized for immobilization improvement.

Keywords: β -galactosidase; *Kluyveromyces marxianus*; lactose hydrolysis; Duolite[®] A-568; adsorption.

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

O leite é muito importante na alimentação dos humanos, é um alimento extremamente rico, composto por uma série de nutrientes, além de ser a maior fonte de cálcio absorvível. O panorama atual do leite no mundo é bastante significativo, no ano de 2017 a produção mundial foi de aproximadamente 502.820.000 toneladas métricas de leite (USDA, 2017). Entretanto, o consumo de leite e seus derivados muitas vezes é limitado, devido à intolerância à lactose, principal carboidrato do leite. A intolerância à lactose afeta grande parte da população e gera sérios desconfortos.

Ressalta-se também a alta produção de soro de leite, que é considerado um subproduto da indústria de laticínios, tem grande potencial como poluidor, em consequência da sua alta demanda bioquímica e química de oxigênio, contudo possui alto valor nutricional e é rico em lactose. Sendo assim, a utilização desse produto, como substrato para fermentações, ingrediente para elaboração de bebidas lácteas dentre outras aplicações na indústria de alimentos vem ganhando destaque no cenário mundial.

Desse modo, a hidrólise da lactose se torna ainda mais considerável, a partir dessa operação é possível elaborar os produtos para intolerantes à lactose, além de trazer benefícios como aumento na digestibilidade do leite e melhoria nas propriedades funcionais dos lácteos.

A enzima β -galactosidase é uma hidrolase que catalisa a hidrólise da lactose formando galactose e glicose. Possui uma importância industrial significativa promovendo diversas melhorias. Na indústria de alimentos uma das principais aplicações dessa enzima está na elaboração dos produtos isentos de lactose. A enzima também é capaz de sintetizar os galacto-oligosacarídeos (GOS) que são considerados prebióticos que ajudam na manutenção da flora intestinal (GÉKAS; LOPEZ-LEIVA, 1985; JOCHEMS et al., 2011; GONZÁLEZ-DELGADO et al., 2016).

A β -galactosidase pode ser proveniente de diversas fontes como animais, plantas e microrganismos. A levedura *Kluyveromyces marxianus* apresenta grande potencial para aplicação biotecnológica, por possuir status GRAS (*Generally Recognized As Safe*), sendo considerada segura para sua aplicação, por assimilar a lactose e utiliza-lá como sua fonte de carbono, além de apresentar rápido crescimento (LANE; MORRISSEY, 2010).

O uso de enzimas livres nos processos industriais é bastante difundido, embora haja necessidades de melhoria, pois, a utilização dos biocatalisadores em sua forma livre gera um

alto custo de processo, pela sua não reutilização, além de dificuldades como a estabilidade, armazenamento e utilização em processos contínuos. Assim, surgem as enzimas imobilizadas com intuito de sanar esses problemas (SHELDON; VAN PELT, 2013).

As enzimas imobilizadas são denominadas como: “enzimas fisicamente confinadas ou localizadas em determinada região definida do espaço, com retenção de sua atividade catalítica, que pode ser usada varias vezes de forma contínua”. Não há um método específico de imobilização, cada enzima e processo possuem suas particularidades que devem ser observadas para a escolha do método de imobilização (CHIBATA, 1978).

Em relação aos métodos de imobilização, a adsorção física tem se destacado, por ser um processo simples, que envolve ligações fracas, praticamente não afeta a estrutura da enzima, além de ser um processo menos oneroso. Em relação à imobilização a escolha do suporte é muito importante para uma boa eficiência do processo. As resinas de troca iônica devem ser mencionadas, pois possibilitam rápido isolamento e separação ao final da reação, processo simples, interações iônicas e eletrostáticas.

Nesse sentido, o estudo da produção e de métodos de imobilização da β -galactosidase de diferentes fontes se mostra importante.

1.1 OBJETIVOS

Com base na importância do tema exposto anteriormente, o presente trabalho apresenta como objetivos. Produzir a enzima β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* e estudar o processo de imobilização da enzima em resina de troca iônica.

1.1.1 Objetivos específicos

Como objetivos específicos, têm-se:

- ✓ Produzir a enzima β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus*;
- ✓ Extrair a enzima β -galactosidase pelo rompimento da célula;
- ✓ Caracterizar o extrato da enzima β -galactosidase em relação à estabilidade ao pH, temperatura, liofilização e estocagem.
- ✓ Estudar o processo de imobilização da β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* em resina de troca iônica Duolite[®] A-568.

- ✓ Avaliar a oferta de atividade, pH e concentração do tampão no processo de imobilização da β -galactosidase;

CAPÍTULO 2

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 LEITE, SORO DE LEITE E PERMEADO DE SORO DE LEITE

2.1.1 Leite

O leite é um dos alimentos mais importantes consumido pelos seres humanos, ele é rico em nutrientes, sendo considerado um alimento completo. É ingerido em todas as fases da vida, sendo o primeiro alimento fornecido aos humanos, por ser fundamental para o crescimento e o bom desenvolvimento desses seres. Além de ser a maior fonte de cálcio absorvível que o homem tem acesso (BUNACIU et al., 2016).

Pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), pela instrução normativa nº 51 publicada em 2002, o leite é o produto oriundo da ordenha completa e ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas (BRASIL, 2002).

O leite é composto por água, proteínas, carboidratos, lipídeos, vitaminas, sais minerais e ácidos orgânicos, sendo que a composição pode variar de acordo com a raça do animal, alimentação, clima, tempo de gestação dentre outros fatores (ORDÓÑEZ, 2005). Assim, é difícil definir a composição exata do leite. Porém, a relação entre os constituintes é bastante estável e qualquer alteração nos componentes pode ser prevista (BLOWEY, 1992). A Tabela 2.1 apresenta os principais componentes do leite de vaca e suas composições.

Tabela 2.1 - Composição média do leite de vaca

Constituinte	Teor (%)	Varição (%)
Água	87,0	85,3-88,7
Lactose	4,6	3,8-3,5
Gordura	3,9	2,5-5,5
Proteínas	3,2	2,3-4,4
Substâncias Minerais	0,65	0,57-0,83
Ácidos Orgânicos	0,18	0,12-0,21
Outros	0,14	-

Fonte: WALSTRA; WOUTERS; GEURTS, 2006

A água é o componente mais importante quantitativamente, representa cerca de 80% do leite. Ela pode estar ligada a componentes como proteínas, lactose e substâncias minerais, mas a maior parte se encontra disponível como água livre. A gordura no leite está disposta em forma de pequenos glóbulos que compreendem principalmente os triacilgliceróis encobertos por membrana lipoproteica. São encontrados no leite 440 ésteres de ácidos graxos, destacando o ácido palmítico e o ácido oleico. A gordura é o componente com maior grau de variação em relação à raça, estação do ano, alimentação (TRONCO, 2008).

A lactose é o principal carboidrato do leite, pequenas quantidades de outros carboidratos também podem estar presentes, ligados a fosfatos, lipídeos e/ou proteínas ou parcialmente livres. A lactose é considerada o açúcar do leite, confere um sabor levemente adocicado, é uma fonte de carbono para microrganismos, importante principalmente na produção de biomassa, etanol, ácidos orgânicos, enzimas e extrato de levedura (WALSTRA; WOUTERS; GEURTS, 2006; KELLY, 2010).

As proteínas do leite são divididas nos produtos lácteos fermentados em caseínas e proteínas do soro. A caseína é considerada a mais importante, representando cerca de 80%, é uma substância coloidal associada com o cálcio e o fósforo, se mantém unida por interações hidrofóbicas e pontes salinas. As proteínas do soro são divididas entre β -lactoglobulina, α -lactoalbumina, soroalbumina, imunoglobulinas e protease-peptonas, possuem menor influência em relação às propriedades físico-químicas do que as caseínas. Elas são utilizadas na indústria de alimentos devido às propriedades nutricionais e funcionais (TRONCO, 2008; ORDÓÑEZ, 2005).

O leite contém também vitaminas lipossolúveis A, D, E e K e hidrossolúveis C e D, sendo estas dispostas em pequenas quantidades. E ainda sais minerais como fosfatos, citratos, cloretos, carbonatos, bicarbonato de sódio, potássio, cálcio e magnésio. E em quantidades menores: cobre, ferro boro, manganês, zinco, iodo, outros (SILVA; SILVA; FERREIRA, 2012; ORDÓÑEZ, 2005).

O leite apresenta como principais propriedades físico-químicas: acidez variando entre 0,14 a 0,18 g de ácido láctico em 100 mL; pH entre 6,4 a 6,9; densidade relativa entre 1,028 a 1,034 g mL⁻¹ e índice crioscópico com valor máximo -0,512. O índice crioscópico é uma característica usada para detecção de adulteração por água (BRASIL, 2002).

2.1.2 Soro Lácteo

O soro lácteo ou também conhecido como lactossoro é um subproduto da indústria de laticínios. Representa a parte líquida remanescente após a coagulação da caseína do leite. Apresenta de 50 a 60% do valor nutricional do leite e é gerado em alta quantidade, em média a cada 10 litros de leite são produzidos cerca de 1 quilograma de queijo e 9 litros de soro (BALDASSO, 2008; GANJU; GOGATE, 2017; MOLLEA; MARMO; BOSCO, 2013).

No Brasil até o primeiro semestre de 2017 a produção de queijos foi de aproximadamente 760.000 toneladas, considerando que a cada 1 quilograma de queijo produzido resulta em 9 litros de soro, a geração de soro é de aproximadamente 6,84 bilhões de litros de soro lácteo. A produção mundial de soro lácteo chegou a um valor aproximado de 177 bilhões de litros, valor bastante considerável (USDA, 2017).

Um dos grandes problemas do soro lácteo está no seu alto poder como poluente, pois apresenta em sua composição alta quantidade de substâncias orgânicas, principalmente a lactose e as proteínas do soro. Devido às suas características, a Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO) pode variar de 30.000 a 60.000 mg O₂.L⁻¹, a depender do processo de elaboração do queijo. Essa carga poluente é muito alta quando comparada ao esgoto doméstico, apresenta carga poluidora cerca de 100 vezes maior. Aproximadamente, a produção diária de 10.000 litros de soro equivale ao esgoto doméstico gerado por uma população de 5.000 habitantes (RICHARDS, 2002; PORTO et al., 2005; MORENO-INDIAS, et al., 2009).

Devido a esse alto potencial como poluidor ambiental e sua alta produção o soro é uma preocupação, assim desde a década de 60 o soro vem sendo introduzido em novas

tecnologias passando de um efluente para matéria-prima valiosa de nutrientes, tornando-se cada vez mais objeto de estudo de diferentes trabalhos com soluções alternativas para sua valorização (BALDASSO, 2008; ALVES et al., 2014; ANDRADE; ALMEIDA NETO; LOPES, 2015; LIMA; FREITAS, 2016).

O soro pode ser classificado em duas categorias de acordo com a forma de remoção da caseína. Se a remoção for realizada por adição de ácido (pH 4,6) o soro é denominado como ácido, sendo subproduto da produção de iogurtes e queijo cottage. Entretanto, se a caseína for removida por ação da renina forma-se o soro doce produzido na elaboração do queijo cheddar, suíço, prato, mussarela, coalho dentre outros (PANESAR et al., 2007; GANJU; GOGATE, 2017). O soro ainda pode ser obtido por separação física das micelas por micro-filtração, formando um concentrado de micelas e proteínas do soro, um concentrado ou isolado protéico (SGARBIERI, 2004).

A composição e o pH do soro doce e ácido podem ser observados na Tabela 2.2.

Tabela 2.2 - Composição e pH do soro doce e soro ácido

	Soro doce (%)	Soro ácido (%)
Umidade	93,0-94,0	94,0-95,0
Gorduras	0,3-0,5	0,3-0,6
Proteínas	0,8-1,0	0,8-1,0
Lactose	4,5 a 5,0	3,8 a 4,2
Cinzas	0,5-0,7	0,7 a 0,8
Ácido Lático e outros	0,1	0,1-0,8
Cálcio	0,05	0,13
Sódio	0,07	0,06
Potássio	0,13	0,15
Fósforo	0,06	0,09
pH	6,4	4,7

Fonte: MADRID; CENZANO; VICENTE, 1996.

A lactose e as proteínas solúveis do soro são os componentes mais importantes do soro de leite. As proteínas possuem alto valor nutricional, por conter todos os aminoácidos essenciais e a lactose por ser fonte de material energético para diversos processos biotecnológicos e como componente utilizado na indústria farmacêutica e alimentícia

(DEKKER; DAAMEN, 2011). As proteínas do soro lácteo podem ser utilizadas em aplicações nutricionais, como fórmulas enterais e infantis; na forma de proteínas nativas ou pré-digeridas que contribuem com o baixo valor calórico dos alimentos na substituição de gordura, ou na formulação de alimentos e bebidas saudáveis (CAPITANI et al., 2005). Segundo Pacheco et al., (2005) as proteínas do soro apresentam vantagens quando comparadas às 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 de não sofrerem alterações conformacionais pelos ácidos estomacais. Ao atingirem o intestino delgado são rapidamente digeridas e seus aminoácidos absorvidos, elevando rapidamente a concentração aminoacídica no plasma e estimulando a síntese de proteínas nos tecidos (SGARBIERI, 2004).

Em 2009 no Brasil somente 50% do soro produzido era utilizado, enquanto que em países desenvolvidos aproximadamente 95% era aplicado na indústria de alimentos (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 tecnologias modernas para obtenção de produtos específicos e/ou novos produtos a serem formulados (PORTO; SANTOS; MIRANDA, 2005; TEIXEIRA; FONSECA, 2008). A seguir são citados diversos trabalhos que aturam no desenvolvimento de novos produtos a partir do soro de leite: Silva et al. (2011) utilizaram soro de leite na elaboração de pães; Muza; Peres; Degáspari, 2014 estudaram o desenvolvimento de iorgute enriquecido com proteína do soro de leite; Lima e Rocha (2016) fabricaram doce de leite com soro lácteo; Luz (2016) avaliou a produção de concentrado proteico por extração das proteínas do soro de leite.

2.1.3 Permeado de soro lácteo

O permeado de soro de leite é um produto rico em nutrientes, é considerado um subproduto da indústria de laticínios e apresenta um grande potencial de aproveitamento no setor industrial. Ele é obtido pela ultrafiltração do soro de leite, nesse processo as proteínas do soro não permeiam a membrana de ultrafiltração formando o concentrado ou isolado proteico de soro, a parte que permeia a membrana é denominado de permeado, uma solução diluída de lactose, minerais e nitrogênio não proteico (GOLOWCZYC et al., 2013 PRAZERES; CARVALHO; RIVAS, 2012).

Este produto apresenta boa solubilidade e sabor lácteo agradável, sendo assim possui potencial para aplicação como ingredientes em formulações. Apresenta também, ótima relação de custo benefício em funcionalidade e sabor aos alimentos. Principalmente pela alta presença de lactose, que é aproximadamente de 76 a 85% em base seca, também possui minerais essenciais, que podem contribuir para o perfil geral no alimento que será aplicado. Em relação à gordura, esta no permeado é extremamente baixa (DAIRY EXPORT COUNCIL, 2016; HU; DICKSON, 2015).

De acordo com suas características, o permeado pode ser aplicado em diversos produtos, tanto na alimentação humana como animal. É usado na reposição de diferentes ingredientes, como: o leite em pó desnatado ou o leite em pó integral, porém não atua em relação às funcionalidades da proteína ou da gordura desses ingredientes, somente como reposição de carboidrato. Também tem sido utilizado para reduzir o sódio em alimentos e adicionar nutrientes em produtos alimentícios, como uma importante fonte de minerais lácteos. De forma geral é utilizado em produtos cárneos, lácteos, panificação, confeitaria, snacks, salgadinhos, sorvetes, suplementos alimentares, ração animal, fármacos e outros (DAIRY EXPORT COUNCIL, 2016; LAVARI et al., 2014).

O principal composto do permeado é a lactose, ela contribui para o escurecimento dos produtos (Reação de Maillard), apresenta sabor menos doce que a sacarose, absorve compostos aromáticos voláteis, possui baixa afinidade com a umidade, é um açúcar cristalizável e atrai e absorve pigmentos sintéticos e naturais. Devido à alta concentração de lactose, o permeado de soro tem sido utilizado como substrato para o crescimento de microrganismos e também para produção dos galacto-oligossacarídeos, que apresentam propriedades prebióticas benéficas ao organismo (DAIRY EXPORT COUNCIL, 2016; GOLOWCZYC et al., 2013).

O permeado de soro de leite apresenta um problema ambiental significativo, visto que mesmo com baixas concentrações de carbono e nitrogênio é um problema crítico, necessita de transformações biológicas elaboradas. Contudo, o desenvolvimento de novas tecnologias e a grande preocupação com a responsabilidade ambiental, tem gerado uma mudança na imagem do permeado de soro que se torna uma fonte rentável de nutriente ao invés de um efluente (VERA et al., 2012).

Devido ao imenso interesse de valorização do permeado de soro de leite, diversos trabalhos da literatura foram realizados com diferentes fins, como é descrito abaixo:

Qureshi; Friedl; Maddox, (2014) aplicaram o permeado de soro de leite na fermentação para produção de butanol.

Rosa; Santos; Silva, (2014) utilizaram o permeado de soro de leite na fermentação para produção de hidrogênio e etanol.

Lavari et al., (2015) produziram *Lactobacillus rhamnosus* 64 a partir da fermentação suplementada com permeado de soro de leite.

Smith; Metzger; Drake, (2016) utilizaram o permeado de soro para substituição do sal em sopas de brócolis por apresentar sabor salgado e não elevar a taxa de sódio. Avaliaram também permeados de diferentes processos de produção de queijos para identificar o que mais apresentava sabor salgado.

Parashar et al., (2016) propuseram uma alternativa para utilização do permeado de soro de leite na fermentação com a levedura *Scharomyces cerevisiae* para a produção de etanol.

2.2 LACTOSE

A lactose é apresentada na forma de um pó branco, cristalino, solúvel em água, insolúvel em álcool e éter. É encontrada principalmente no leite, sendo considerado o açúcar do leite, tem baixa solubilidade e baixo poder adoçante. Constitui uma fonte de carbono para os microrganismos, principalmente leveduras que crescem no leite, com o objetivo de produzir lácteos fermentados, biomassa, etanol, enzimas e ácidos orgânicos (BRITO, 2007; WALSTRA; WOUTERS; GEURTS, 2006).

Está presente no leite de praticamente todos os mamíferos, em uma concentração de 2 a 10%. No leite bovino a concentração é de 4,4 a 5,2% enquanto no leite humano a concentração é de aproximadamente 7%. É um dissacarídeo formado por dois radicais, β -D galactose e α -D glicose que são unidos por ligação glicosídica β -1,4. Este carboidrato é considerado um açúcar redutor, visto que o carbono anomérico se encontra livre para reações com agentes oxidantes (HOLSINGER, 1988; CAMPBELL, 2000).

Nos sistemas lácteos a lactose pode existir em várias formas, cristalinas e não cristalinas. A qualidade de certos alimentos e a estabilidade de armazenamento é afetada pelo estado físico da lactose (CHANDRAPALA; WIJAYASINGHE; VASILJEVIC, 2016).

A lactose tem uma vasta aplicação, principalmente pelas suas características físico-químicas em relação aos outros açúcares. Por apresentar poder adoçante menor que a

sacarose, a lactose é utilizada na formulação de alimentos sem interferir no sabor natural dos outros componentes. Em produtos assados, a lactose promove a reação de Maillard, que melhora a coloração da crosta. A lactose carameliza em altas temperaturas e contribui para o sabor e cor. Ela também atua nutricionalmente, promovendo a absorção de cálcio e fósforo, essa característica é útil em formulações infantis (FENNEMA; DAMADARAN; PARKIN, 2010).

De forma geral, na indústria de alimentos a lactose pode ser usada em produtos de confeitarias e padarias, como xarope e preparação de condimentos. A lactose também pode ser utilizada na indústria farmacêutica, sendo em pó, concentrada e parcialmente acidificada, além de passar por vários tratamentos subsequentes (FOX; MC SWEENEY, 1998; BOZA; GOMES; BLUMER, 2013).

A lactose também é um açúcar fermentescível, pode ser metabolizada por microrganismos produzindo substâncias importantes como:

- ✓ *Ácido Lactobiônico*: pode ser obtido por via microbiana e também por oxidação da lactose. Possui as seguintes propriedades: emulsionante e estabilizante de espuma podendo ser utilizado em detergentes e sabões. Também é aplicado na indústria de fármacos como conservante de órgãos transplantados, na vetorização de drogas e na elaboração de produtos anti-fotoenvelhecimento, hidratantes e rejuvenescedores (BOZA; GOMES; BLUMER, 2013; VALLE, 2009);
- ✓ *β -galactosidase*: a lactose é utilizada como fonte de carbono na fermentação de microrganismos que podem produzir esta enzima.
- ✓ *Ácido Láctico*: por ação das bactérias lácticas a molécula de lactose pode ser transformada em ácido láctico. Ele possui características importantes na indústria de alimentos, química e farmacêutica, sendo muito utilizado na produção de leites fermentados, queijos frescos, produção de bebidas, alimentos em conserva, matéria-prima na elaboração de ácidos e óxido propileno, além de ser usado em etapas de acabamento na indústria têxtil (VIJAYAKUMAR et al., 2008).

Outro produto é a lactulose, um dissacarídeo formado por frutose e galactose, obtido pela isomerização da lactose ou por bioconversão, que tem sido estudado pela ação de enzimas como glicose-isomerase, β -galactosidase e celobiose 2-epimerase provenientes de diferentes microrganismos. A lactulose tem uma vasta aplicação, em alimentos (iogurtes,

aditivo alimentar) e na indústria farmacêutica no tratamento de encefalopatia hepática, acidente vascular cerebral isquêmico. Ainda, no ano de 2011, a Comissão Europeia autorizou a utilização da lactulose como ingrediente na alimentação animal, diminuindo o uso de antibióticos, por apresentar ação prébiotica, aumentar a absorção de minerais, prevenção e redução de infecções no trato urinário dentre outros pela norma (nº 575/2011) *Quality and Safety of Feeds and Food for Europe* (BOZA; GOMES; BLUMER, 2013).

A lactose também pode ser transformada enzimaticamente em galacto-oligossacarídeos (GOS), que não são digeríveis pelo trato gastrointestinal humano, agindo como prebióticos, estimulando o crescimento de bifidobactérias. São utilizados com aditivos alimentares desempenhando funções no corpo humano, como manutenção do equilíbrio intestinal da microflora, aumentando a digestibilidade dos produtos lácteos, prevenção do câncer de cólon, produção de ácidos graxos de cadeia curta, aumentam a absorção de cálcio e magnésio além da eliminação de compostos tóxicos (GONZÁLEZ-DELGADO et al., 2016; SRIVASTAVA; MISHRA; CHAND, 2015; TOMAL et al., 2010).

A lactosacarose é um oligossacarídeo, um açúcar de baixo teor calórico com duração do estímulo doce maior do que a sacarose e também atua, estimulando o crescimento de bifidobactérias. É obtida a partir da bioconversão da lactose e sacarose pela enzima β -frutofuranosidase (IKEGAKI; PARK, 1997).

Diante do exposto, fica nítida a importância da lactose, principalmente na indústria de alimentos, mais especificamente na indústria de laticínios. Entretanto, problemas nutricionais (intolerância à lactose) e também interesses tecnológicos (poder adoçante, funcionalidade, solubilidade) têm incentivado estudos, na elaboração de produtos lácteos isentos ou com baixo teor de lactose, atendendo às necessidades nutricionais e industriais dos processos.

2.2.1 Intolerância a lactose

A intolerância a lactose é denominada como a não digestão da lactose, neste caso o corpo humano é incapaz de produzir a β -galactosidase ou não produz em quantidades suficientes. A enzima é responsável por hidrolisar a lactose em glicose e galactose, em condições normais. Após a hidrólise os produtos obtidos são posteriormente metabolizados pelo organismo. Entretanto, quando há intolerância à lactose, a mesma não é digerida e uma série de incômodos são causados (MATTAR; MAZO, 2010).

A intolerância à lactose afeta cerca de 75% da população mundial, sendo que o norte da Europa tem ocorrência de aproximadamente 5% e a Ásia e a África representam 90%. No Brasil a prevalência é de 20 a 25% e os estudos mostram que a ocorrência é crescente na região nordeste apresentando cerca de 75% dos casos, enquanto o sul e o sudeste apresentam de 8% a 45% respectivamente (PRETTO et al., 2002; PEREIRA FILHO; FURLAN, 2004; MARTINS et al., 2011).

De acordo com estudos epidemiológicos, as populações que dependiam da pecuária mais do que da agricultura nos seus primórdios, ou seja, apresentavam maior consumo de leite e derivados, apresentam menor prevalência de intolerância à lactose em relação às dependentes da agricultura (MATTAR; MAZO, 2010).

Existem três tipos de intolerância à lactose, de acordo com a sua ocorrência: deficiência congênita da enzima; diminuição enzimática secundária e deficiência primária (FARIAS; FAGUNDES NETO, 2004; LONGO, 2006; MATTAR; MAZO, 2010).

- ✓ **Deficiência congênita de lactase:** é herdada e autossômica recessiva, um defeito muito raro que se manifesta em recém-nascidos. Os sintomas são identificados logo na primeira ou segunda ingestão de leite. A condição é permanente e poucos casos são identificados na população mundial.
- ✓ **Deficiência enzimática secundária:** é causado normalmente em consequência de doenças que afetam a mucosa intestinal ou após cirurgias no aparelho digestivo, ou ainda em prematuros que possuem imaturidade enzimática ocasionada por processos infecciosos levando a deficiência temporária de lactase, de acordo com a recuperação das células pode ser reversível, mas em certos casos pode gerar intolerância.
- ✓ **Deficiência primária ou ontogenética:** é o tipo mais comum, é causada por uma tendência natural do organismo que diminui a produção de lactase com o avançar da idade.

O diagnóstico da intolerância à lactose pode ser feito por diferentes métodos, como: teste de tolerância à lactose, teste respiratório do hidrogênio expirado e por biopsia (GASPARIN; CARVALHO; ARAUJO, 2010).

- ✓ **Teste de tolerância à lactose:** após ingestões excessivas de lactose é realizada a dosagem de glicose sanguínea. Porém, o teste pode ser mascarado em pessoas com alterações nas taxas glicêmicas.

- ✓ **Teste respiratório do hidrogênio:** avaliação das taxas de hidrogênio expirado, produto da fermentação da lactose ingerida e não absorvida.
- ✓ **Biopsia:** é baseado na medida da atividade enzimática da lactase no intestino, entretanto, o método é invasivo. E também pode não ser eficiente, pois a lactase pode variar sua atividade enzimática na superfície do intestino.

A não ou má produção da lactase pode gerar muitos sintomas no organismo humano, incluindo principalmente: dores abdominais, vômitos, flatulência, inchaço e diarreia (SEMRAD; POWELL, 2008).

O tratamento da intolerância inclui quatro princípios gerais: (i) redução ou restrição dietética da lactose, (ii) a substituição com fontes de nutrientes alternativos evitando reduções no consumo de energia e proteína, (iii) regulação na ingestão de cálcio e vitamina D e (iv) utilização de β -galactosidase exógena (MONTALTO et al., 2006; COENEN et al., 2000). Também existem preparações farmacêuticas de β -galactosidase que aumentam a digestão da lactose e reduzem os sintomas, porém a eficácia é diferente nas preparações e não ajudam todos os indivíduos igualmente (INSUMOS, 2017).

Existe diferença entre a intolerância, a alergia e a sensibilidade à lactose. A intolerância envolve a digestão ou o metabolismo da lactose, devido à ausência ou baixa produção da lactase. A alergia é uma resposta do sistema imunitário a certos componentes alimentares, normalmente proteínas. E a sensibilidade é uma resposta anormal, muitas vezes semelhante à alergia (INSUMOS, 2017).

Como alternativa para intolerantes à lactose é realizada a hidrólise da lactose como tecnologia para elaboração de produtos lácteos com baixo teor de lactose. Outras técnicas também podem ser utilizadas para retirada da lactose no leite, como por exemplo, processo de separação por membranas e cromatografia. A hidrólise normalmente é realizada utilizando a β -galactosidase.

2.2.2 Hidrólise da Lactose

A lactose quando passa por processo de hidrólise forma uma mistura isomolecular de glicose e galactose. Quando a lactose é hidrolisada há um aumento na doçura do meio pela formação dos dois monossacarídeos mais doces, permite a elaboração de produtos para intolerantes à lactose e aumenta a qualidade dos produtos lácteos, além de ampliar a eficiência do processo em laticínios (HARJU; KALLIOINEN; TOSSAVAINEN; 2012).

A hidrólise da lactose pode ocorrer de duas formas, por processos ácidos ou processos enzimáticos:

Hidrólise ácida: é uma reação rápida comparada a hidrólise enzimática, porém, utiliza soluções de ácidos fortes (sulfúrico e clorídrico) em altas concentrações e condições severas de pH (1,0 a 2,0) e temperatura (100-150°C) para condução das reações (HATZINIKOLAU et al., 2005).

Hidrólise enzimática: utiliza-se β -galactosidase na forma livre ou imobilizada, esta enzima hidrolisa a ligação β -1,4 da molécula de lactose, formando galactose e glicose. O método enzimático é realizado em condições consideradas mais brandas, quando comparado a hidrólise ácida (pH = 3,5 - 8,0; T = 5 - 60°C). Desse modo, a incidência de alterações indesejáveis no produto, necessidade energética e a corrosão de equipamentos são menores (BAILEY; OLLIS, 1986; SENER; KILIC; OZBEZ, 2006).

A reação de hidrólise da lactose forma inicialmente glicose e galactose. Todavia, a depender das condições a mistura isomolecular pode não ser alcançada. Há uma competição entre a reação de hidrólise e a transgalactosilação. O mecanismo das reações pode ser observado na Figura 2.1, inicialmente a enzima atua sobre a lactose, posteriormente forma-se o complexo enzima-galactosil e a simultânea liberação da glicose. Em sequência o complexo enzima-galactosil é transferido para um acceptor com grupo hidroxil. Em solução com baixa concentração de lactose a água ao contrario do comportamento de outros açúcares é mais competitiva para ser o acceptor desse complexo, desse modo a galactose é liberada. Caso a concentração de lactose seja alta, as moléculas de lactose e demais mono, di e oligossacarídeos são mais promissoras para atuar como acceptoras do complexo enzima-galactosil, formando os galacto-oligossacarídeos (GOS) (MICHELON et al., 2014; TORRES et al., 2010).

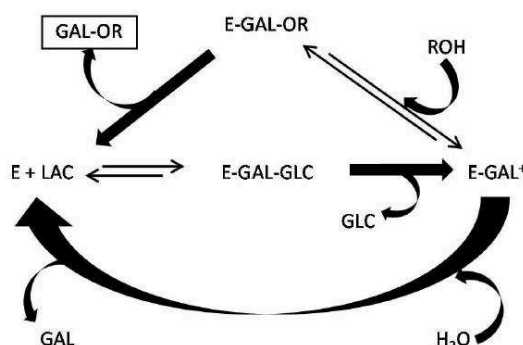


Figura 2.1 - Mecanismo proposto para formação de oligossacarídeos (GAL: Galactose, E: Enzima, LAC: Lactose, GLC: Glicose, ROH: Radical hidroxila).

Fonte: MAHONEY, 1998.

A hidrólise da lactose fornece inúmeras vantagens para indústria de alimentos, principalmente na elaboração dos produtos isentos de lactose, além de diminuir a cristalização da lactose em produtos lácteos prevenindo o desenvolvimento de textura arenosa. Há também uma economia de sacarose na preparação de produtos açucarados, considerando que a doçura da lactose hidrolisada é de aproximadamente 70% da doçura da sacarose. Outra vantagem é a hidrólise da lactose presente no soro de leite formando um xarope doce que pode ser utilizado no processamento de lácteos, confeitos e indústria de refrigerantes, assim além de beneficiar a indústria de alimentos, pode resolver problemas ambientais devido ao alto potencial poluidor do soro de leite no meio ambiente (GROSOVA et al., 2008; PANESAR; KUMARI; PANESAR, 2010).

2.3 ENZIMAS

As enzimas podem ser definidas como biocatalisadores, possuem natureza protéica ou glicoprotéica, apresentam atividade intracelular ou extracelular e atuam acelerando reações bioquímicas, reduzindo a energia de ativação necessária para realizar a conversão de substrato em produto, sem alterar o equilíbrio da reação. Elas viabilizam a atividade das células, quebrando ou ligando-as formando novos compostos. As propriedades das enzimas são determinadas por sua natureza protéica, dentre elas destacam-se: a especificidade ao substrato, dependência da temperatura e pH (FURIGO; PEREIRA, 2001; FABER, 2004; NELSON; COX, 2014).

A diferença principal entre as enzimas e os catalisadores químicos sintéticos é a capacidade dos primeiros catalisarem reações em condições mais brandas de temperatura,

pressão e em soluções aquosas. Logo, reduzem a possibilidade de alteração de compostos sensíveis ao calor, diminuem as necessidades energéticas e os efeitos de corrosão do processo (BAILEY; OLLIS, 1986).

Em relação à obtenção das enzimas, estas podem ser oriundas de plantas, animais e microrganismos como fungos filamentosos, bactérias e leveduras. A fonte é muito importante para determinação das características e propriedades de cada enzima (KRAJEWSKA, 2004). A produção das enzimas mais usual é a através dos microrganismos, assim, a escolha destes é muito importante para que sejam apropriados e eficientes na obtenção das enzimas (REGULY, 2000).

A aplicação das enzimas é motivada principalmente pelas suas propriedades que são desejáveis nos processos biotecnológicos, tais como:

- ✓ Alta estabilidade, alta eficiência catalítica, possibilidade de obtenção de produtos com melhor qualidade quando comparado a outros métodos catalíticos (POLSHETTIWART et al., 2011);
- ✓ Possibilidade de regulação da atividade enzimática, pois para isso basta modificar a natureza do meio de reação, alterar o pH ou adicionar suplementos (PIZARRO; PARK, 2003);
- ✓ Possuir mecanismo de “*turnover*”, desempenhando a mesma função consecutivamente, sem serem consumidas no processo (OGURI, 2007);
- ✓ As enzimas catalisam as transformações moleculares sem ocorrência de reações paralelas, comuns em sínteses químicas, devido à sua especificidade (PATEL, 2002).

Dessa forma, as enzimas podem ser aplicadas em uma gama de processos, nas indústrias de alimentos, químicas e farmacêuticas. Além disso, são muito utilizadas para fins analíticos (KRAJEWSKA, 2004). Entretanto, o custo de utilização das mesmas é relativamente alto, sendo este um fator limitante da sua aplicação direta, o que muitas vezes pode ser inviável economicamente. Com intuito de reduzir esses custos e ampliar a aplicação das enzimas, são utilizados os métodos de imobilização (KLEIN, 2010).

2.3.1 Enzima β -galactosidase

A enzima β -galactosidase ou lactase é classificada como uma hidrolase que catalisa o resíduo terminal β -galactopiranosil da lactose, formando galactose e glicose (GÉKAS;

LOPEZ-LEIVA, 1985; LONGO, 2006; KLEIN, 2010; SILVÉRIO et al., 2017; CHANALIA et al., 2018).

A β -galactosidase foi utilizada durante muitos anos em clínicas médicas na elaboração de pequenas quantidades de leite com baixo teor de lactose para alimentação de adultos e crianças. Entretanto, nos anos sessenta a enzima despertou interesse comercial com a possibilidade de venda de maior quantidade de leite e pela necessidade de buscar novas alternativas para aplicação do soro de leite (MAHONEY, 1997).

Atualmente a enzima exibe uma importância significativa na indústria, sendo cada vez mais estudada em diferentes condições de processos e fontes de obtenção. A principal aplicação está na elaboração de produtos com baixo teor de lactose de maneira a sanar as necessidades dos intolerantes à lactose.

Está enzima também é capaz de sintetizar os galacto-oligossacarídeos (GOS), que são carboidratos formados por no máximo sete unidades de galactose e uma de glicose terminal, apresentam resistência à ação das enzimas digestivas, não sendo digeríveis. São considerados prebióticos, pois ao serem consumidos incrementam o crescimento, principalmente da população de *Bifidobacterium* reduzindo a concentração de bactérias putrefativas. Possuem baixos valores energéticos e baixa doçura. São responsáveis pela melhoria e regulação do trânsito intestinal, ajudam na absorção de minerais, em especial o cálcio e magnésio e reduzem os riscos de câncer de cólon (LISBOA et al., 2012; GONZÁLEZ-DELGADO et al., 2016).

2.3.2 Principais fontes de β -galactosidase

A β -galactosidase está amplamente distribuída na natureza podendo ser encontrada em plantas, animais e microrganismos como bactérias, fungos filamentosos e leveduras. A produção por microrganismos é a mais aplicada, sendo as leveduras e os fungos os mais utilizados como fonte de obtenção (LANE; MORRISSEY, 2010; KISHORE; KAYASTHA, 2012; ANSARI; SATAR, 2012).

Nem todas as lactases são reconhecidas como seguras para aplicação na indústria de alimentos, pois de acordo com a fonte de obtenção podem oferecer riscos de toxicidade, relacionados aos extratos brutos de coliformes (GÉKAS; LOPEZ-LEIVA, 1985). No Brasil, a legislação aponta pela Resolução RDC nº 53 de 07 de Outubro de 2014, que a enzima lactase para utilização na indústria de alimentos deve ser de origem microbiana, proveniente dos

seguintes microrganismos: *A. niger*, *A. oryzae*, *C. pseudotropicalis*, *K. lactis*, *K. fragilis*, *K. marxianus*, *Saccharomyces sp.* (BRASIL, 2014). Essas espécies podem ser classificadas como *Generally Recognized As Safe* (GRAS) pela *Food and Drug Administration* (FDA), sendo esse um importante critério para aplicações alimentícias.

As propriedades das β -galactosidases são dependentes da sua fonte de obtenção, elas podem apresentar diferenças marcantes tanto em características químicas como cinéticas (LADERO et al., 2000; HEIDTMANN et al., 2012).

β -galactosidases de leveduras: apresentam grande potencial de uso, principalmente em escala industrial. Podem ser obtidas em grandes quantidades utilizando soro de queijo como substrato e os custos são relativamente baixos. Apresentam temperatura ótima na faixa de 30 a 40 °C e o pH ótimo de 6,0 a 7,0, essa faixa de pH é bem próxima à do leite que é de 6,4 a 6,9, dessa forma apresentam grande potencial para aplicação na indústria do leite (MAHONEY, 1997; PANESAR; KUMARI; PANESAR, 2010).

Dentre as leveduras mais utilizadas destacam-se: *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Sccharomyces sp.* e *Candida pseudotropicalis*.

β -galactosidases de fungos filamentosos: os fungos estão entre os mais estudados para a produção das lactases, as enzimas destes possuem pH ótimo na faixa de 2,5 a 4,5, mais baixa do que das obtidas por leveduras. A temperatura de atuação é alta, podendo ser superior a 50 °C. Outra importante característica para aplicação industrial é que a maioria das enzimas de fungos são extracelulares, facilitando a recuperação (HUSAIN, 2010).

Os fungos filamentosos mais utilizados são: *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus phoenus*, *Mucor pocillus*, *Mucor miehei*, *Scopuloriopsis*, *Alternaria palmi*.

β -galactosidases de bactérias: muitas bactérias podem ser produtoras de lactase, *Streptococcus thermophilus*, *Bacillus thermophilus* e *Escherichia coli* são consideradas as fontes primordiais dessa enzima, porém está última teve sua aplicação reduzida por apresentar risco de toxicidade, não sendo usada para aplicação em alimentos. Esse fato pode explicar a maior utilização dos fungos filamentosos e leveduras. Porém, as bactérias ácido lácticas (LAB) termofílicas são consideradas uma fonte interessante de obtenção enzimática, são classificadas como GRAS com destaque para as espécies *Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*. As β -galactosidases destas culturas possuem alta estabilidade e atividade em altas temperaturas, que aumenta a taxa de hidrólise da lactose e também previne o

crescimento de microrganismos indesejáveis. Entretanto as lactases obtidas desses microrganismos são intracelulares e de difícil recuperação (USTOK; TARI; HARSA, 2010).

Na Tabela 2.4 podem-se observar propriedades distintas de algumas β -galactosidases microbianas.

Tabela 2.3 - Propriedades de β -galactosidases de diferentes fontes 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 ⁺² , K ⁺
	<i>K. lactis</i>	200	6,9-7,3	7-7,75	35-40	K ⁺ , Mg ⁺²

Fonte: MARIOTTI, 2000

De acordo com o descrito, diversos trabalhos da literatura estão sendo realizados com microrganismos distintos para produzir β -galactosidases com várias características, como é mostrado na Tabela 2.4.

Tabela 2.4 - Diferentes microrganismos estudados para produção de β -galactosidase

Microrganismo	Referência
<i>A. niger</i>	BARBOSA; ARAUJO, 2007; NIU et al., 2017
<i>A. oryzae</i>	GUIDINI, 2009; ALBUQUERQUE, et al., 2017; FALLEIROS et al., 2017
<i>C. pseudotropicalis</i>	INCHAURRONDO et al., 1994
<i>G. pullulans</i>	SONG et al., 2010
<i>K. fragilis</i>	LADERO et al., 2002
<i>K. lactis</i>	SILVA, 1997; ALEJANDRA; RAMÍREZ; NILO., 2003; FREITAS, 2013; ERICH et al., 2015;
<i>K. marxianus</i>	SANTIAGO et al., 2004; MEDEIROS, 2008; PURI et al., 2010; BRAGA et al., 2013; LEMES et al., 2014; FALLEIROS, 2016; YOU et al., 2017
<i>S. thermophilus</i>	GEIGER et al., 2016

A obtenção da β -galactosidase é diferente para cada estirpe sendo regulada pela natureza nutricional, fisiológica e bioquímica das espécies microbianas aplicadas (XIA et al., 2010; LIU et al., 2011; YU; O’SULLIVAN, 2014). Fatores ambientais e de fermentação como temperatura de crescimento, agitação, tempo, pH, quantidade de inóculo, aeração, íons metálicos, fontes de carbono e de nitrogênio interferem diretamente no rendimento da produção da enzima (PRAKASAM et al., 2005; RAO et al., 2008). Logo, uma etapa fundamental para se obter um aumento na produção da enzima é a otimização dos constituintes do meio, conseguindo reduzir também a quantidade de compostos não utilizados nos meios, com intuito de elevar o rendimento e reduzir os custos (KAMRAN et al., 2016).

2.4 LEVEDURA *Kluyveromyces marxianus*

O gênero *Kluyveromyces* apresenta grande potencial para uso industrial, estas leveduras são capazes de assimilar lactose e inulina (RUBIO TEXEIRA, 2006). Para produção da β -galactosidase há inúmeras vantagens da utilização destas leveduras como:

classificação como microrganismos seguros, bom rendimento de crescimento e ampla faixa de temperatura (RECH, 1998; LANE; MORRISEY, 2010).

A *K. marxianus* é definida como uma levedura ascomiceta, homotálica e aeróbica, filogeneticamente relacionada à *Sacharomyces cerevisiae* e *K. lactis* (LORENTE et al., 2000). Sua principal característica é a capacidade de assimilar lactose e utilizar este açúcar como fonte de carbono, característica comum à *K. lactis*. Muitas das aplicações de *K. marxianus* tomam vantagem de estirpes específicas para produzir etanol quando crescendo em substratos contendo açúcares como inulina ou lactose. Esta característica, que está ausente em *S. cerevisiae*, conduz ao isolamento destas leveduras a partir de fontes lácteas, por exemplo, leites fermentados, iogurtes e queijos (LANE; MORRISSEY, 2010).

Para aplicação da *K. marxianus* há um destaque e interesse particular na lactose como fonte de carbono, com intuito de ampliar a utilização do soro de leite que contém concentração significativa de lactose, além disso as enzimas dessa levedura possuem status GRAS sendo importantes na aplicação na indústria de alimentos (LANE et al., 2011; RAIMONDI et al., 2013).

2.5 EXTRAÇÃO, CONCENTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO

A produção da enzima β -galactosidase pela levedura *K. marxianus* acontece intracelularmente, sendo assim há necessidade de ruptura da célula para obtenção da enzima. Para a extração da proteína, diferentes métodos podem ser utilizados, como é mostrado na Figura 2.3, dependendo da força física da parede celular dos microrganismos, localização dentro da célula, estabilidade e do uso desejado para o composto de interesse (PANDIT et al., 2005; PINHEIRO et al., 2003, GÜNERKEN et al., 2015).

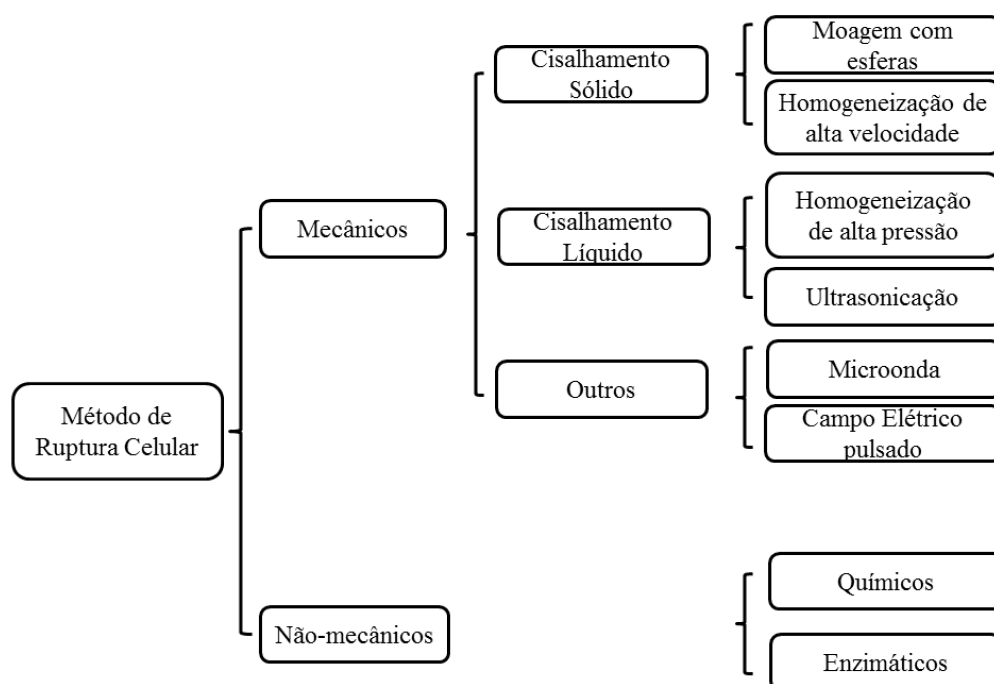


Figura 2.2 - Classificação dos métodos de ruptura celular

Fonte: GÜNERKEN et al., 2015

Utilizando o método químico, durante a extração ocorre a permeabilização da parede celular das células viáveis da levedura. Para extração da β -galactosidase de leveduras o método mais usado para autólise celular é o tratamento da suspensão celular com agentes químicos que desorganizam a membrana plasmática, como solventes orgânicos, policátions, proteínas básicas ou soluções com alto poder iônico (FLORES et al., 1994).

A parede celular das leveduras é rompida quando utilizados métodos físicos. Estes não são indicados quando se deseja um processo seletivo, sendo que após a ruptura da parede celular, o conteúdo por inteiro é extravasado, podendo causar degradação de compostos de interesse por ação das próprias enzimas que estão no meio (SALAZAR; ANSEJO, 2007).

Dos métodos mecânicos destacam-se o rompimento mecânico com esferas de vidro e o rompimento por ultrassom. O primeiro método é feito de forma manual e não necessariamente faz-se uso de equipamentos e recursos. Utiliza basicamente pérolas de vidro, sendo estas colocadas em um tubo contendo a suspensão celular, o tubo é agitado vigorosamente por tempo determinado e a enzima é extraída por força de atrito, proveniente da moagem com as esferas de vidro como abrasivos (MEDEIROS et al., 2008).

Já o rompimento por processador ultrassônico é feito através de ondas ultrassônicas que são dissipadas no sistema líquido através de bolhas de cavitação, as quais formam uma

espécie de campo, no qual ocorre aumento de massa e conseqüente transferência de calor para o meio líquido, gerando um gradiente de velocidade e a criação de uma força capaz de romper as células e liberar a enzima. Este método vem sendo muito aplicado em diversos processos (BOSSIO et al., 2008).

Para a purificação e recuperação enzimática existem inúmeras técnicas, porém são dificultadas pela quantidade de etapas. A escolha da técnica está relacionada às propriedades moleculares inerentes às enzimas. Desse modo, a combinação correta de várias etapas que exploram estas propriedades permitirá a purificação a partir de uma mistura. Nas etapas iniciais é desejável na maioria das vezes reduzir o volume, nesse caso é comumente utilizada a precipitação fracionada com sais ou solventes orgânicos. Em seguida, são utilizadas técnicas que exploram interações eletrostáticas como a cromatografia de troca iônica. Nas etapas finais o objetivo normalmente é obter um aumento de resolução, sendo utilizadas técnicas como cromatografia em gel e cromatografia de afinidade. Uma estratégia geral não é muito indicada, pois os materiais disponíveis e as necessidades para cada caso são desiguais (RABELO, 2005; HARRIS, 2001).

Ao final da purificação é necessário realizar uma concentração final, para facilitar o manuseio das etapas seguintes. A retirada da água para realizar a concentração pode ser realizada por: adição de polímeros, liofilização e remoção de solvente utilizando membrana de ultrafiltração (LIMA et al, 2001).

Outra técnica de purificação que vem sendo utilizada é união das etapas de imobilização e purificação em uma única etapa. É baseada, no princípio da afinidade da enzima com o suporte, assim sendo deve-se conhecer a interação enzima-suporte. O interesse por essa técnica é ainda maior quando a enzima final obtida apresenta melhora na estabilidade por meio das ligações covalentes multipontuais (BARBOSA et al., 2015).

2.6 IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS

As enzimas apresentam grandes vantagens como biocatalisadores, entretanto o uso das enzimas livres em processos industriais é dificultado devido à instabilidade, o alto custo e a difícil recuperação ao final dos processos e como alternativa eficiente surgem as enzimas imobilizadas. A imobilização permite a reutilização das enzimas, possibilita utilização em processos contínuos, facilita downstream, além de aumentar a estabilidade no processo e também no armazenamento (SHELDON; VAN PELT, 2013).

A enzima pode ser definida como imobilizada, quando está fisicamente ou quimicamente ligada em um suporte ou matriz com retenção de sua atividade catalítica, podendo ser utilizada repetidas vezes (CHIBATA, 1978).

O primeiro trabalho relatado sobre imobilização de enzimas foi no início do século XX, no ano de 1916, Nelson e Griffin imobilizaram invertase em carvão ativado e alumina. Porém, foi somente na década de 60 que as pesquisas se tornaram mais intensas com intuito de determinar métodos eficientes para imobilização das enzimas. Katchalski foi o responsável por introduzir os primeiros suportes para imobilização de enzimas (LIMA et al., 2001; NISHA; KARTHICK;GOBI, 2012). A partir da década de 70 aumentaram o número de pesquisas com enzimas imobilizadas (ROSEVEAR, 1984).

Atualmente a imobilização de enzimas tem se mostrado uma técnica vantajosa, melhorando a aplicação das enzimas nos processos, melhora a rigidez enzimática e consequentemente contribui para estabilidade, acarretando em aumento de atividade e seletividade enzimática. Sendo cada vez mais utilizadas na produção de alimentos, fármacos, e outros produtos biológicos importantes, como exemplos produção de xarope de glicose, produção de leite e derivados com baixo teor de lactose, síntese de peptídeos, síntese de aromas, formulações de sabão em pó dentre outros (MATEO et al., 2007; BARBOSA et al., 2015; SOLEIMANI; KHANI; NAJAFZADEH, 2011).

Apesar da imobilização de enzimas estar cada vez mais difundida, não há técnicas universais ou totalmente eficientes, porém existem uma diversidade de aplicações, parâmetros e possibilidades (KLEIN, 2010).

A imobilização de enzimas acrescenta custos ao processo tanto, pelo uso de suportes, como pelo custo da enzima, porém esse custo é compensado na possibilidade de reutilização da enzima, em processos bateladas, contínuos e também em reatores tubulares (HARJU et al., 2012).

A imobilização de enzimas agrega propriedades que valorizam a utilização dos biocatalisadores nos processos, de acordo com diversos autores (SHULER; KARGI, 1992; KRAJEWSKA, 2004; GOMEZ et al., 2005; GROSOVÁ et al., 2008; SHELDON; VAN PELT, 2013; KLEIN et al., 2016; ALBUQUERQUE et al., 2016):

- Possibilita a reutilização da enzima, diminuindo o custo do processo;
- Facilita a recuperação da enzima e produto;
- Apresenta maior estabilidade tanto no processo operacional como no armazenamento;

- A enzima não contamina o produto;
- Melhor controle operacional;
- Flexibilidade no projeto do reator;
- Possibilita o processamento de grandes quantidades de substrato, visto que o produto pode ser separado e recuperado da mistura substrato-produto;
- Reutilização sem perda significativa de atividade;
- Permite a utilização de alta concentração de enzima em um volume menor de reator, diminuindo assim o volume de reação;
- Proporciona maior controle do processo catalítico.

A imobilização pode gerar algumas modificações nas propriedades químicas e físicas das enzimas. A estabilidade, as propriedades cinéticas e especificidade, além da produtividade da enzima imobilizada devem ser avaliadas. As causas das modificações nas enzimas imobilizadas podem ocorrer por inúmeras razões (KENNEDY; CABRAL, 1987; SHELDON, 2007), tais como:

- *Efeitos estereoquímicos*: o sítio ativo da enzima fica inacessível devido à imobilização de parte da molécula.
- *Efeitos conformacionais*: mudança na conformação da molécula causada pela modificação na estrutura terciária do sítio ativo.
- *Efeitos de partição*: efeito causado na natureza química do material do suporte, com possibilidade de interações eletrostáticas e hidrofóbicas entre a matriz e moléculas de baixa massa molecular existente na solução, podendo gerar alterações do microambiente.
- *Efeitos difusionais ou transferência de massa*: se forma pela resistência de difusão de solução do substrato para os sítios catalíticos e difusão dos produtos.

Os fatores descritos podem alterar as características da enzima imobilizada, gerando mudanças nas propriedades cinéticas, modificando os valores de K_m e V_m , deslocando a faixa de pH e temperatura da enzima, afetando a estabilidade (MARKOGLOU, 2003; MATEO et al., 2007).

Para sanar os problemas na imobilização enzimática é necessário levar em consideração a escolha do método de imobilização, analisando cuidadosamente todos os detalhes envolvidos. Os seguintes fatores são imprescindíveis para escolha do método: suporte adequado, quantidade de água, tipo de solvente e também é importante avaliar a solubilidade dos substratos e produtos (VIEIRA, 2009).

2.7 MÉTODOS DE IMOBILIZAÇÃO

Existem diferentes técnicas de imobilização, entretanto mesmo com várias pesquisas não se pode afirmar com certeza qual o melhor método para imobilizar enzimas, não existe um método único, uma vez que cada enzima possui características bioquímicas específicas.

No desenvolvimento do processo de imobilização enzimática é importante considerar os seguintes fatores: simplicidade no método de imobilização, resistência mecânica da enzima imobilizada, possibilidade de acoplar a imobilização com a purificação da enzima, impacto da imobilização na atividade catalítica, estabilização da enzima através da prevenção de interações intermoleculares pelo enrijecimento estrutural da enzima ou pela prevenção da dissociação de subunidades da enzima, modulação da seletividade e/ou especificidade da enzima, diminuição nos problemas de inibição (GARCIA-GALAN et al., 2011).

Como há uma grande diversidade de métodos de imobilização é muito importante considerar todas as características para uma boa escolha. De acordo com Scouten (1987), os métodos em geral apresentam vantagens e desvantagens que devem ser ponderadas e analisadas para os biocatalisadores e para reação enzimática. Deve-se escolher o método mais simples, com melhor custo, que leve a uma imobilização satisfatória com boa atividade e estabilidade operacional para uma viável aplicação das enzimas imobilizadas nos processos.

Diferentes técnicas podem ser aplicadas na imobilização de enzimas em suportes sólidos, sendo baseados em métodos físicos e químicos. Dentre os métodos de imobilização estão: retenção física, a qual descreve o confinamento das moléculas da enzima em uma matriz polimérica, microcápsula ou membrana; uso de reagente multifuncional através de ligações cruzadas e imobilização por ligação da enzima a um material insolúvel. Como é representado na Figura 2.3 (HAIDER; HUSAIN, 2009).

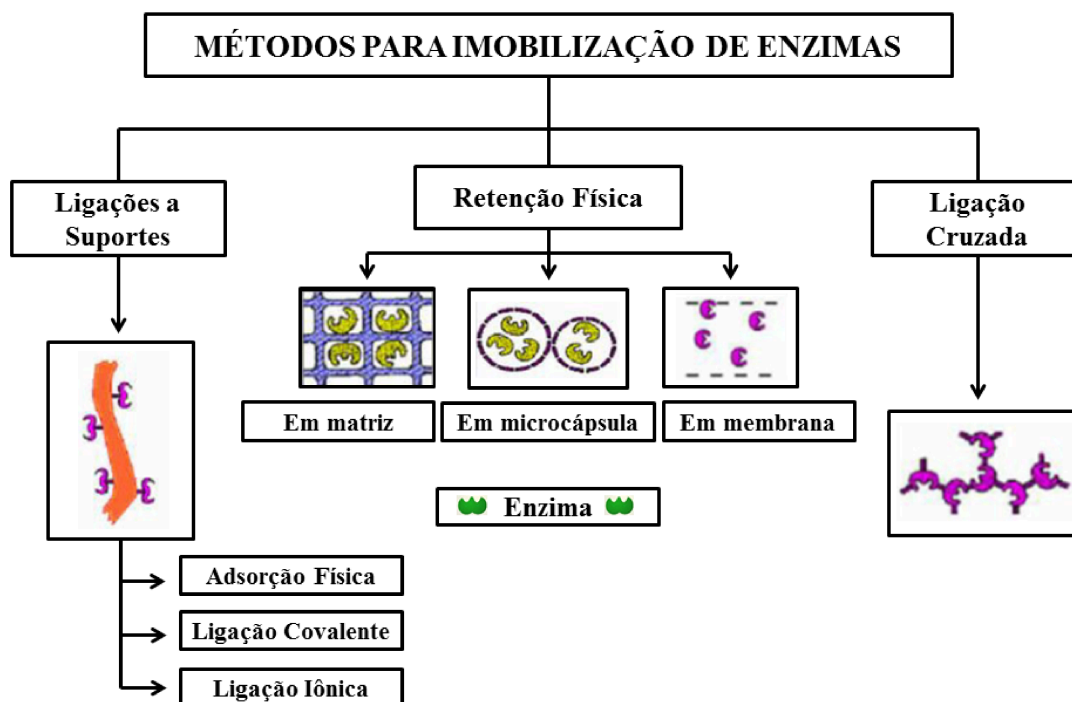


Figura 2.3 - Métodos para imobilização de enzimas
 Fonte: adaptado DALLA-VECCHIA et al., 2004

2.7.1 Imobilização por ligações a suportes

2.7.1.1 Imobilização por Adsorção Física

Este método tem como base a adsorção física da enzima na superfície de suportes insolúveis e é considerada uma técnica simples. A enzima fica retida no suporte através de ligações fracas: interações de Van der Waals, interações hidrofóbicas, ligações de hidrogênio e interações específicas. O método promove pequena perturbação sobre a estrutura nativa da enzima (CHIBATA, 1978; TANAKA; KAWAMOTO, 1999; PANESAR; KUMARI; PANESAR, 2010). Em decorrência da ligação por interações fracas, o método tem como desvantagem a dessorção da enzima do suporte, além de apresentar sensibilidade às condições do ambiente como a temperatura e a concentração dos íons no meio (GROSOVÁ et al., 2008; NISHA; KARTHICK; GOBI, 2012; DATTA et al., 2013).

O processo é realizado através da exposição da solução enzimática ao suporte em condições controladas: de pH, natureza do solvente, força iônica da solução, quantidade de

enzima, temperatura e tempo de contato, com posterior separação que pode ser feita por centrifugação ou filtração (COSTA et al., 2005; GARCIA-GALAN et al., 2011).

Em muitos casos para melhorar a imobilização através da adsorção física utiliza-se reagentes bi ou multifuncionais, como glutaraldeído e diisocianato de tolueno que atuam como agentes de ligação cruzada, melhorando a estabilidade do biocatalizador (CAO, 2005).

2.7.1.2 Imobilização por ligações covalentes

Nesse tipo de imobilização, ocorre ligação da enzima ao suporte após ativação do mesmo. A ligação ocorre entre um grupo nucleofílico da enzima (comumente grupo amino) e um grupo eletrofílico do suporte após uma ativação adequada. A ativação dos grupos funcionais é feita por reagentes químicos, como: brometo cianogênio, glutaraldeído e carbodiimida. Para imobilização da enzima o suporte deve apresentar grupos livres como hidroxila, amida, carboxila ou amina, ou deve ser modificado para que os grupos sejam ativados. Para a proteção do sítio ativo, é aconselhável que a imobilização seja realizada na presença do substrato ou um inibidor competitivo (GEKAS; LÓPEZ-LEIVA, 1985; CAO, 2005; PANESAR; KUMARI; PANESAR, 2010).

É um dos métodos mais difundidos de imobilização, normalmente as condições de reações não são brandas, podendo em alguns casos, modificar a estrutura conformacional da enzima e alterar o centro ativo, conseqüentemente diminuir a atividade e especificidade de substrato. Entretanto, a ligação enzima-suporte é forte e estável, não há perda da enzima para solução mesmo na presença de substratos ou soluções de alta força iônica. Desse modo, a enzima imobilizada pode apresentar alta resistência a temperaturas, a agentes desnaturantes e a solventes orgânicos. Tudo dependerá das condições do sistema, do tipo de suporte e características da enzima (KENNEDY; CABRAL, 1987; NISHA; KARTHICK; GOBI, 2012).

O glutaraldeído é normalmente usado como reagente nas imobilizações industriais, sendo que a ligação covalente é formada por um radical ativo do suporte e um grupo da enzima (SIRISHA; JAIN; JAIN, 2016).

A imobilização por ligação covalente apresenta como vantagens: fácil interação da enzima desde que esteja na superfície do suporte, a enzima não se solta do suporte. E como desvantagens: altos custos, em algumas situações baixo rendimento de imobilização em conseqüências à exposição das enzimas a reagentes tóxicos ou condições extremas de reações.

Além disso, a reutilização do suporte em uma nova imobilização não é possível, pois a enzima inativa não pode ser separada do suporte (TANAKA; KAWAMOTO, 1999).

A ligação covalente também pode ser multipontual, na qual a estabilidade da enzima imobilizada pode ser aumentada, ocorre com suportes altamente ativados com espaçadores curtos e múltiplos resíduos de aminoácidos na superfície da enzima, Figura 2.4. Assim, há uma rigidificação da estrutura da enzima e as mudanças conformacionais que geram inativação são reduzidas (MARTINEK et al., 1977; MOZHAEV et al., 1990).

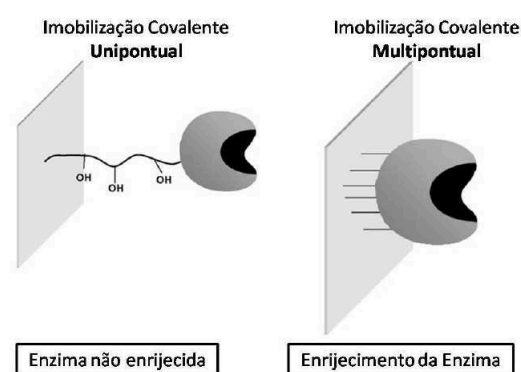


Figura 2.4 - Efeito da imobilização na estabilidade da enzima
Fonte: MATEO et al., 2007

Com intuito de intensificar a reação entre enzima e suporte na ligação covalente multipontual a imobilização é realizada em pH alcalino, embora possa ser realizada em pH neutro. É importante considerar que enquanto o pK dos grupos aminos terminais da proteína estão entre 7 e 8, o pK dos grupos de Lis expostos apresentam pK superior a 10,5 (MATEO et al., 2007).

O estudo de Mateo et al., (2007) concluiu que utilizando ligação covalente multipontual há um aumento na rigidez da estrutura tridimensional da molécula da enzima, que promove de forma geral uma estabilidade elevada da enzima imobilizada na presença de agentes inativantes como temperatura, pH, solventes orgânicos dentre outros. Para o acontecimento da ligação multipontual algumas características são requeridas pelo suporte, como: grupos reativos estáveis o bastante para que ocorra ligação enzima-suporte por períodos longos, grande área superficial interna, alta densidade superficial de grupos reativos e mínimo impedimento estérico dos grupos reativos.

As condições de imobilização também são fundamentais para maximizar a imobilização. Desse modo, fatores como: tempo de reação, pH, temperatura, tampão utilizado

e presença de inibidores ou outras proteínas protetoras devem ser considerados e manipulados com atenção (MATEO et al., 2007).

2.7.1.3 Imobilização por ligação iônica

Esse método é baseado na ligação iônica da enzima com o suporte sólido, que contém trocadores de íons. A ligação iônica e a ligação de Van der Waals ocorrem juntas na prática. A imobilização através de ligação iônica apresenta força de ligação da enzima-suporte mais forte do que o método por adsorção física. Porém, o processo de imobilização é realizado da mesma forma. Na imobilização as condições requeridas são brandas quando comparada com as utilizadas no método por ligação covalente e as alterações conformacionais são pequenas (ALMEIDA et al., 2005; MOHAMAD et al., 2015).

A principal desvantagem do método é a possibilidade de desprendimento da enzima do suporte, frente a alguma perturbação como variação no pH e na força iônica do meio. Como vantagens esse tipo de imobilização apresenta: baixo custo, simplicidade do método, possibilidade de reutilização do suporte, disponibilidade de suportes e produção de enzimas imobilizadas com alta atividade (COSTA et al., 2005).

2.7.2 Imobilização por retenção física

Acontece a retenção física das enzimas em espaços intersticiais que podem ser de géis, microencapsulas ou em fibras. A principal vantagem do método é a não modificação estrutural das enzimas, que são protegidas por substâncias de alto peso molecular. O processo é simples, não há modificação química das enzimas (CHIBATA, 1978; DATTA et al., 2013).

✓ **Em matriz:** ocorre por confinamento das enzimas em lacunas da matriz polimérica que são formadas em torno do biocatalisador. Dentre os suportes utilizados os géis são imensamente aplicados, com eles a imobilização é realizada juntando a enzima com a solução com um monômero solúvel, após a mistura há uma polimerização e insolubilização do polímero por diversas estratégias (ORDÓÑEZ, 2005).

✓ **Em microcápsula:** as enzimas são envolvidas em membranas semipermeáveis ou em micelas reversas formadas por surfactantes. Elas estão livres em solução, porém em um espaço restrito. O método apresenta como vantagem a

grande área superficial de contato do substrato e enzima em um volume pequeno e também a possibilidade de imobilização de diversas enzimas em uma etapa só (KENNEDY; CABRAL, 1987).

- ✓ **Em membrana:** utiliza membranas pré-formadas (reatores tipo *hollow fiber*) ou a formação *in situ* da membrana em torno das enzimas que serão imobilizadas. A técnica é realizada colocando a solução de enzima e o substrato em contato íntimo no mesmo lado da membrana (KENNEDY; CABRAL, 1987; NISHA; KARTHICK;GOBI, 2012).

2.7.3 Imobilização por ligação cruzada

Na ligação cruzada não há presença de suportes, as enzimas estão ligadas umas nas outras por proteínas inativas (gelatina, albumina) formando uma estrutura tridimensional complexa. Os agentes bi ou multifuncionais podem ser utilizados para favorecer as ligações entre as enzimas (SHELDON, 2007).

Entre os agentes de ligação cruzada mais utilizados destaca-se o glutaraldeído, ele leva a autoreticulação das enzimas, formando uma rede tridimensional de moléculas de enzima, como é apresentado o mecanismo de reação na Figura 2.5 (KENNEDY; CABRAL, 1987).

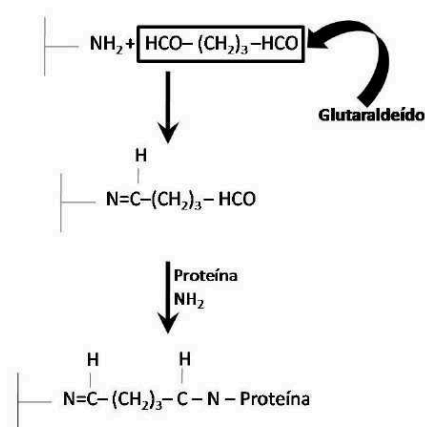


Figura 2.5 - Mecanismo de reação de *cross-linking* com glutaraldeído

Fonte: WANG, 1976

O método apresenta como desvantagem, a necessidade de elevada quantidade de enzima, o que acarreta em baixas retenções da atividade e baixa estabilidade mecânica. Logo,

a reprodutibilidade é baixa e a aplicação industrial é dificultada. Como alternativas, foram desenvolvidas métodos de ligação cruzada empregando os cristais de enzimas (*CLEC - cross-linked enzymes crystals*), método de formação de agregados físicos por precipitação e seguinte entrecruzamento (*CLEAs - cross-linked enzyme aggregates*) das enzimas do agregado. O uso dos *CLEAs* tem se destacado por extensa possibilidade de aplicação, por sua simplicidade e conservação da atividade (SHELDON, 2007; JOSIC et al., 2001; HAGE, 2002).

A imobilização por ligação cruzada é influenciada por alguns fatores, que podem interferir na retenção da atividade e estabilidade das enzimas, tais como a natureza e a quantidade do agente ligante, o meio de imobilização, temperatura, pH, força iônica e precipitantes utilizados. Como não são utilizados suportes, as enzimas se sustentam nos seus aglomerados, o que gera a inativação daquelas que ficam no centro do aglomerado. Desse modo, os aglomerados possuem baixa estabilidade aos solventes orgânicos, à altas temperaturas, baixa estabilidade mecânica e baixa reprodutibilidade, considerando que as ligações acontecem ao acaso (CAO, 2005).

Proporcionando melhoria na estabilidade e aumento de atividade das enzimas imobilizadas, para aplicações industriais têm-se utilizado as ligações cruzadas juntamente com outros métodos de imobilização, como: ligação iônica com posterior ligação cruzada da enzima com o glutaraldeído (MATEO et al., 2007; CAO, 2005).

2.8 SUPORTES PARA IMOBILIZAÇÃO

Diversos materiais podem ser utilizados como suportes na imobilização de enzimas. É necessário considerar determinados fatores para a escolha do suporte em cada processo de imobilização. Devem ser analisados: pH, natureza hidrofóbica e hidrofílica, morfologia, composição, resistência mecânica, carga, presença de íons metálicos na superfície, resistência ao ataque microbiológico, resistência à compactação em operações que utilizam reatores de leito fixo que apresentam altas vazões, possibilidades de modificações físicas (tamanho, área superficial, diâmetro, outros) e químicas. Também é importante considerar as propriedades da enzima a ser imobilizada e as características do processo no qual o biocatalisador será aplicado (MILETC, et al. 2012 ;HETTIARACHCHY, 2018).

Os suportes podem ser classificados como orgânicos e inorgânicos de acordo com a sua composição. Os orgânicos podem ser naturais (agar, celulose, amido, colágeno, quitosana, outros) ou sintéticos (poliestireno, nylon, poliamidas, poliácridatos, outros). E os inorgânicos

podem ser minerais (areia, betonita, pedra-pome, argilas, outros) e fabricados (vidro, sílica, cerâmica, óxido de ferro, outros) (GONÇALVES, 1996; GALVÃO, 2004).

Classificam os suportes também como porosos, não porosos ou estrutura de gel. Os materiais porosos possuem grande área disponível para imobilização e protegem a enzima da turbulência externa. Os não porosos são vantajosos em relação à ausência da resistência à transferência de massa interna, mesmo possuindo baixa área superficial. E os géis são usados quando a grade formada tem tamanho de malha suficiente e retém proteína sem ocasionar restrições difusionais ao substrato (ZANIN, 1989; GONÇALVES, 1996).

As características como elevada força mecânica, resistência a solventes orgânicos, fácil regeneração por pirólise, estabilidade a oscilações na pressão, temperatura e pH torna os suportes inorgânicos mais adequados para aplicação industrial. Entretanto, as matrizes orgânicas são mais utilizadas, visto que uma grande variedade de grupos funcionais podem ser introduzidos nos suportes orgânicos (ROSEVEAR, KENNEDY; CABRAL, 1987; CASTRO et al., 2000).

2.8.1 Imobilização em resinas

A imobilização de enzimas em resinas como suportes é bastante relevante na obtenção de biocatalisadores aplicados em processos biotecnológicos, como indústria de alimentos, farmacêutica, tratamento de resíduos e processos químicos em geral. A imobilização em resina de troca iônica possibilita rápido isolamento e separação ao final da reação, diminuindo custos operacionais. O procedimento é simples, quando comparado a outros métodos, envolve simplesmente interações iônicas e eletrostáticas entre os íons da proteína e os íons opostos da resina (LETCA et al., 2004).

O método apresenta a desvantagem de possibilidade de desprendimento da enzima, na decorrência de modificações no pH e na força iônica do meio. Entretanto as vantagens são diversas, como recuperação do suporte, baixo custo e boa disponibilidade. As resinas são de natureza complexa, sendo na maioria dos casos polímeros. Os íons ativos são cátions em um trocador catiônico e ânions em um trocador aniônico (CABRAL et al. 2008).

As resinas de troca iônica de diferentes tipos podem ser produzidas de acordo com a constituição da matriz, grupos de troca e as características físico-químicas (RIANI, 2008). A troca iônica é realizada pela troca de íons presentes em uma solução e os íons sólidos da resina. As resinas aniônicas trocam os seus ânions disponíveis (OH⁻ e Cl⁻) com ânions do meio

até alcançar o equilíbrio. E as resinas catiônicas, são semelhantes fazem a troca de cátions (Na^+ ou H^+) com o meio (KREMER, 2007).

A maior parte das resinas de troca iônica sintéticas são formadas por matrizes de copolímeros como estireno-divinilbenzeno ou fenol-formaldeído, na forma de partículas. O que confere a funcionalidade das resinas são os grupamentos ácidos ou básicos inseridos nos núcleos de benzeno dos monômeros (KREMER, 2007).

Dentre os grupamentos básicos inseridos nas cadeias das resinas aniônicas, as amins terciárias produzem as resinas fracamente básicas e os quaternários de amônio produzem as resinas fortemente básicas. Dos grupamentos ácidos, o que sobressai é o ácido sulfônico, que produz a resina catiônica fortemente ácida e o mais raro é o ácido carboxílico, que produz a resina catiônica fracamente ácida (FALLEIROS, 2012 apud GONZALEZ, 2010).

De acordo com o fabricante (Rohm Haas) a resina Duolite[®] A-568 é de troca aniônica, fracamente básica, granular e altamente porosa, com matriz de fenol-formaldeído policondensado. Possui estrutura hidrofílica que combinada com a distribuição controlada do tamanho dos poros, torna esta resina mais adequada para aplicação como suporte na imobilização de enzimas de diversos bioprocessos. A força iônica, o tamanho das partículas, e volume de poro dessa resina foram projetados para otimizar a imobilização das enzimas em diversos processos como indústria de amido, gordura, leite dentre outras indústrias alimentícias.

Nesse contexto, muitos estudos da literatura foram desenvolvidos com as resinas de troca iônica na imobilização de várias enzimas:

Oosterom et al., (1998) utilizaram as enzimas β -galactosidase de *A. oryzae* e de *K. fragilis* para imobilização em resina de troca iônica, fenol-formaldeído, tipo Duolite[®] S-761 e Duolite[®] A-7, respectivamente.

Ozdural et al., (2008) imobilizaram β -galactosidase em resina de troca iônica Duolite[®] A-568, que é fracamente básica. A imobilização foi feita em reator contínuo e concluiu que o melhor ajuste cinético foi à equação de Michaelis-Menten.

Marquez et al., (2008) otimizaram a imobilização da invertase por adsorção em resina de troca iônica Duolite[®] A-568 para hidrólise da sacarose.

Guidini et al., (2010) imobilizaram β -galactosidase de *A. oryzae* em resinas de troca iônica com objetivo de hidrolisar a lactose e a melhor atividade alcançada foi com a resina Duolite[®] A-568.

Cabral et al., (2012) realizaram o estudo da imobilização da invertase em resina de troca iônica a melhor atividade foi com a resina Duolite® A-568 na produção de açúcar invertido.

Costa, (2012) estudou a imobilização de α -galactosidase de *A. niger* em resina de troca iônica Duolite® A568.

Güardez et al., (2012) estudaram a imobilização de β -galactosidases de *A. oryzae* por adsorção simples em resina Duolite® A568.

Fischer et al., (2013) avaliaram a hidrólise da lactose com β -galactosidase de *A. oryzae* imobilizada em resina de troca iônica Duolite® A-568 por combinação de adsorção e ligação cruzada com glutaraldeído.

Falleiros et al., (2017) estudaram a imobilização de β -galactosidase de *A. oryzae* em resina Duolite® A-568 utilizando combinação de métodos.

2.9 IMOBILIZAÇÃO DE β -GALACTOSIDASE

A β -galactosidase tem grande aplicação na indústria de alimentos, principalmente na produção de lácteos, contudo sua estabilidade é moderada, o que pode dificultar a utilização em determinados processos industriais. Nesse sentido, estratégias devem ser utilizadas para sanar esse problema, a imobilização enzimática é uma dessas técnicas (PANESAR et al., 2010). Esta enzima vem sendo imobilizada em suportes orgânicos e inorgânicos por diferentes métodos como adsorção, ligações covalentes, agregação química, inclusão e microencapsulação (HUSAIN, 2010).

Diante do exposto, vários estudos têm sido realizados nos últimos anos com intuito de imobilizar β -galactosidase de diferentes fontes por métodos distintos, como pode ser observado nos trabalhos citados abaixo.

A empresa finlandesa de laticínios chamada Valio trabalhou no início dos anos 70, com a imobilização de uma enzima própria, Valio IML, que é uma β -galactosidase imobilizada para aplicação no processo de hidrólise da lactose. A imobilização foi realizada em resina adsorvente. Como vantagens a empresa obteve uma hidrólise de até 95%, além de menores custos com enzimas e possibilidade de utilização em processo contínuo (INSUMOS, 2010).

Szczodrak, (2000) estudou a imobilização de β -galactosidase de *K. fragilis* em vidro poroso silanizado modificado com glutaraldeído. Os resultados mostraram que houve uma

retenção de mais de 90% da atividade inicial da enzima imobilizada que foi utilizada na hidrólise do permeado de soro a 50 °C e pH 6,0. A conversão de lactose foi entre 86 a 90% no processo contínuo e batelada.

Hronská et al., (2009) imobilizaram β -galactosidase de *K. lactis* em cápsulas de hidrogel de álcool polivinílico LentiKats[®] para hidrólise da lactose no leite. A enzima imobilizada apresentou potencial na hidrólise em tampão fosfato e também no leite UHT. Também foi possível observar que o LentiKats[®] pode ser utilizado repetidas vezes e em várias temperaturas na hidrólise da lactose.

Guidini et al., (2011) estudaram a cinética da hidrólise da lactose da β -galactosidase de *A. oryzae* imobilizada em resina de troca iônica Duolite[®]A-568 por combinação de métodos, ligação iônica e reticulação com glutaraldeído. O modelo que melhor se ajustou aos resultados experimentais foi o Modelo Michaelis-Menten com inibição competitiva por galactose e a temperatura de maior estabilidade foi 60°C.

Campello et al., (2012) imobilizaram β -galactosidase de *K. lactis* em Eupergit[®] C e avaliaram as propriedades do biocatalisador. Realizaram um planejamento Plackett-Burman para avaliar a imobilização, com as seguintes variáveis: força iônica, pH, tempo, concentração de galactose, concentração de magnésio, volume de enzima e temperatura. Força iônica e pH foram os efeitos significativos. A enzima imobilizada apresentou ganho na estabilidade térmica aumentando quatro vezes o tempo de meia-vida a 45 °C. Em relação à hidrólise da lactose do soro de queijo, foi observada uma ampliação na conversão da lactose a 40 e 45 °C em comparação com a enzima livre.

Gürdaz et al., (2012) estudaram a imobilização de β -Galactosidase proveniente de *A. oryzae* através de adsorção em Resina Duolite[®]A-568, para aplicação na hidrólise da lactose. A imobilização foi avaliada em relação a tempo, pH e temperatura. As melhores condições alcançadas foram a 35 °C, pH 4,5, 5 mg mL⁻¹ de concentração de enzima e uma hora de imobilização. A β -galactosidase imobilizada apresentou-se mais ativa em todas as temperaturas avaliadas em comparação com a enzima livre. O pH se apresentou mais alcalino após o processo de adsorção.

Lima et al., (2013) realizaram um estudo comparativo entre β -galactosidase de *K. lactis* NRRL Y1564 solúvel e imobilizada em quitosana. A enzima produzida foi caracterizada em relação ao seu pH e temperatura ideal de operação, estabilidade térmica e parâmetros cinéticos (K_m e V_{max}). A β -galactosidase imobilizada se sobressaiu em relação à livre, quanto à estabilidade térmica e também o desempenho da hidrólise da lactose.

Fischer et al., (2013) avaliaram a hidrólise da lactose em sistema de leito fixo com β -galactosidase imobilizada em resina de troca iônica Duolite[®] A-568 por com combinação de métodos adsorção e ligação cruzada com glutaraldeído. Alcançaram conversão total de 82% para os dois reatores em série.

Mörschbacher et al., (2016) realizaram a imobilização de β -galactosidase de *K. lactis* em esferas de alginato de cálcio e gelatina, usando glutaraldeído e concanavalina A (ConA) como agentes modificadores. A enzima foi aplicada na hidrólise da lactose no soro de queijo. Como resultado da pesquisa, a enzima imobilizada com ConA em esferas de alginato-gelatina sem glutaraldeído foi a que se sobressaiu na hidrólise da lactose, alcançando uma conversão máxima de 72%.

Vasileva et al., (2016) avaliaram a hidrólise da lactose do soro de leite por uma β -galactosidase de *E. coli* imobilizada em biorreator com uma membrana em espiral. A enzima foi imobilizada covalentemente em uma membrana de polipropileno modificada usando glutaraldeído. Os resultados obtidos mostraram que a β -galactosidase imobilizada foi 1,6 vezes mais eficaz na hidrólise da lactose do que a enzima na forma solúvel.

Falleiros et al., (2017) estudaram a imobilização de β -galactosidase de *A. oryzae* em resina Duolite[®]A-568 utilizando combinação de métodos. Após a imobilização a enzima foi caracterizada. O processo de imobilização utilizando três métodos (adsorção física, incubação em tampão pH 9 e reticulação) apresentou atividade e estabilidade superior às imobilizações realizadas somente com adsorção física e reticulação. A enzima imobilizada apresentou boa estabilidade ao pH (1,5 – 9,0) e à temperatura (50 °C).

CAPÍTULO 3

MATERIAL E MÉTODOS

O material utilizado e o desenvolvimento experimental do trabalho e também a metodologia empregada são descritos neste capítulo. Na Figura 3.1 são ilustradas em um fluxograma as etapas estudadas neste trabalho.

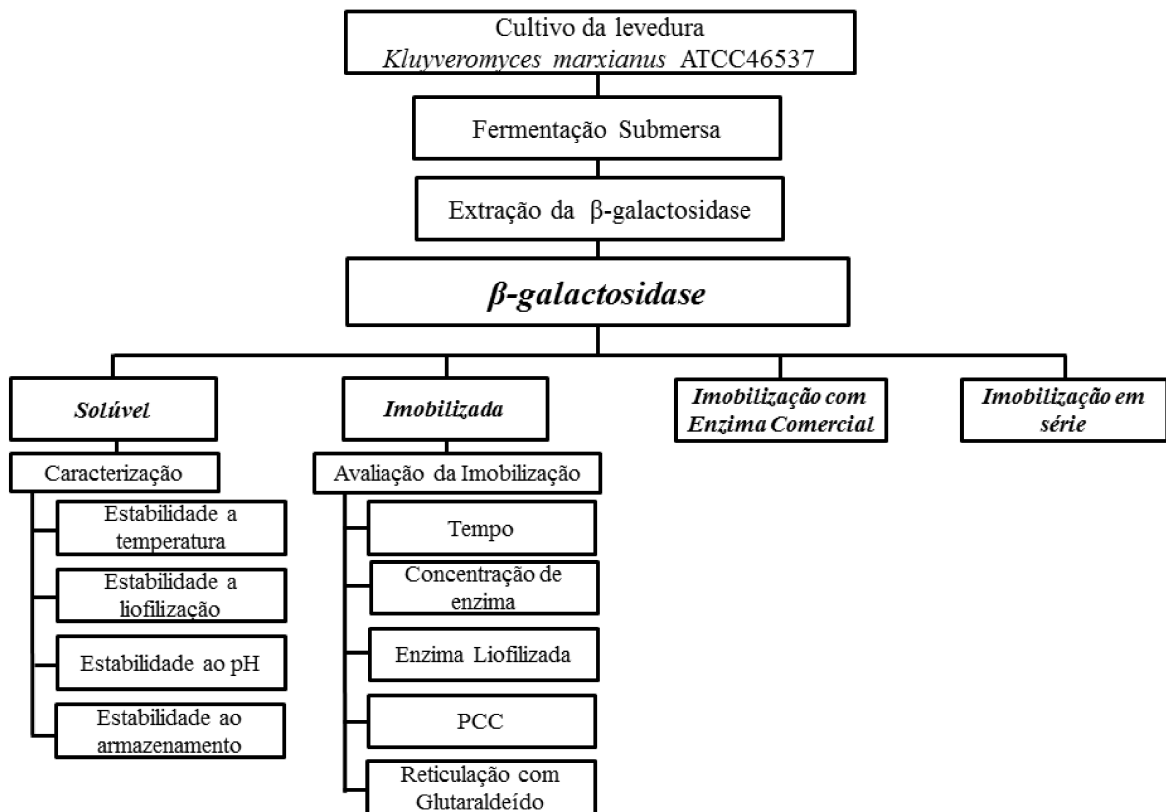


Figura 3.1 - Fluxograma do desenvolvimento da metodologia experimental

3.1 MATERIAL

3.1.1 Microrganismo

Para obtenção da β-galactosidase o microrganismo utilizado foi a levedura *K. marxianus* ATCC 46537, proveniente da Coleção de Culturas Tropicais da Fundação André Tosello de Campinas (SP), na forma reativada (*slant* sem duplicata). No Anexo A pode ser visto o certificado de análise.

3.1.2 Manutenção da Cultura

Conforme recomendado pela Fundação André Tosello a cultura foi mantida a 4°C em meio YMA (Yeast-Malt Extract Agar). Na Tabela 3.1 pode ser visto a composição do meio de manutenção (YMA). A cultura foi repicada mensalmente.

Tabela 3.1 - Composição do Meio de Manutenção YMA

Componentes	Concentração (g L ⁻¹)
Extrato de levedura	3,0
Extrato de malte	3,0
Peptona	5,0
Glicose	10,0
Agar	20,0

3.1.3 Substratos

3.1.3.1 Substrato para fermentação

O permeado de soro de leite comercializado na forma de pó foi utilizado no presente trabalho como principal fonte de carbono na formulação dos meios de cultura para o crescimento da levedura *K. marxianus* ATCC 46537. O produto foi adquirido da empresa SOORO localizada em Marechal Cândido Rondon no Estado do Paraná, as especificações técnicas são apresentadas no Anexo B.

3.1.3.2 Substrato para determinação da atividade enzimática

Para determinação da atividade catalítica da enzima β -galactosidase utilizou-se solução de lactose (PA) 50 g.L⁻¹ preparada em tampão láctico pH 6,5 recomendado pela Novo Nordisk (1993), constituído de água destilada, sais e 0,01% de ázida sódica como bactericida. A Tabela 3.2 apresenta as diferentes concentrações dos sais utilizados na preparação do tampão.

Tabela 3.2 - Composição do Tampão Lático

Componentes	Concentração (g L ⁻¹)
C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ · 2 H ₂ O	0,795
C ₆ H ₈ O ₇ · H ₂ O	1,663
K ₂ SO ₄	0,180
K ₂ HPO ₄	0,520
KH ₂ PO ₄	1,470
KOH	1,090
MgCl ₂ · 6 H ₂ O	0,830
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	0,750
NaOH	0,800
NaHCO ₃	0,280

Fonte: NOVO NORDISK, 1993

3.1.4 Inóculo

O meio de cultura utilizado para cultivo da levedura *K. marxianus* ATCC 46537 foi baseado no meio proposto e otimizado por Falleiros, 2016, apresentado na Tabela 3.3. O principal componente do meio foi o permeado do soro de leite, que contém como fonte principal de carbono a lactose.

Tabela 3.3 - Composição do meio inóculo para cultivo da *K. marxianus*

Componentes	Concentração (g L ⁻¹)
Lactose (Permeado de Soro)	50,0
Extrato de Levedura	6,0
(NH ₄) ₂ SO ₄	6,0
KH ₂ PO ₄	5,0
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,6

Fonte: FALLEIROS, 2016

O meio foi preparado em tampão fosfato 0,2 M pH 5,5. A cultura foi mantida a 30 °C, 120 rpm por 14 horas em incubadora rotatória. Em exceção da lactose que foi obtida a partir do permeado de soro de leite, os reagentes utilizados foram de grau analítico.

3.1.5 Meio de cultura para fermentação

O meio de cultura utilizado para fermentação da levedura *K. marxianus* ATCC 46537 foi similar ao utilizado no cultivo da levedura, porém em concentrações maiores de permeado de soro de leite e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e na ausência de extrato de levedura, o meio foi preparado em tampão fosfato 0,2 M pH 7,0, conforme a Tabela 3.4.

Tabela 3.4 - Composição do meio de cultura para fermentação da *K. marxianus*

Componentes	Concentração (g L^{-1})
Lactose (Permeado de Soro)	100
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	6,26
KH_2PO_4	5,0
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,6

Fonte: FALLEIROS, 2016

3.1.6 Suporte para imobilização

Para imobilização da enzima β -galactosidase o suporte utilizado foi a resina de troca iônica Duolite[®] A-568 (Rohm Haas), doada pela Dow Chemical Company. A resina pode ser vista na Figura 3.2



Figura 3.2 - Resina Duolite[®] A-568

A resina Duolite[®] A-568 é um trocador aniônico fracamente básico e tem como princípio a ligação cruzada fenol-formaldeído. É utilizada como suporte (orgânico sintético)

de enzimas em bioprocessos cujas principais características indicadas pelo fabricante são apresentadas na Tabela 3.5.

Tabela 3.5 - Características da Resina Duolite[®] A-568 (Rohm Hass)

Características	Propriedades da Resina
Estrutura Hidrolítica	Matriz: Fenol-formaldeído Grupo funcional: Amina Terciária Forma física: Granular
Alta Porosidade	Cor: Verde a cinza
Distribuição do tamanho e volume dos poros	Tamanho do poro: 15 a 25 nm Volume do poro: 0,78 a 1 mL/g Densidade: 1,10 a 1,14 g/mL Capacidade total de troca iônica: ≥1,20 equivalente/L

3.1.7 Unidade Experimental

As unidades experimentais foram montadas no Laboratório de Engenharia Bioquímica da Faculdade de Engenharia Química e são descritas a seguir:

3.1.7.1 Unidade experimental para fermentação

A β -galactosidase de *K. marxianus* foi produzida por fermentação submersa em duas configurações de reator: reator cônico de bancada e fermentador Biostat B.

O reator cônico de bancada mostrado na Figura 3.3 foi utilizado para preparo do inóculo, era constituído de erlenmeyer de volume total de 250 mL, fechado com rolha de gaze e algodão hidrófobo. Sendo que, 30% do volume total era ocupado pelo meio de cultura. As fermentações foram realizadas em incubadora rotatória a 120 rpm, 30 °C por 14 horas.

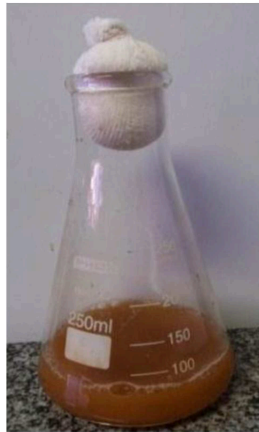


Figura 3.3 - Reator Cônico de Bancada utilizado na preparação do inóculo

Na Figura 3.4 é mostrado o fermentador Biostat B, da marca B. Braun Biotech International, que consiste em um vaso cilíndrico com volume de 2,0 L, fechado com tampa de aço inoxidável que contém orifícios para alimentação de inóculo, saída de amostra, entrada e saída de gás, dotado de controle de pH, temperatura, agitação e aeração.

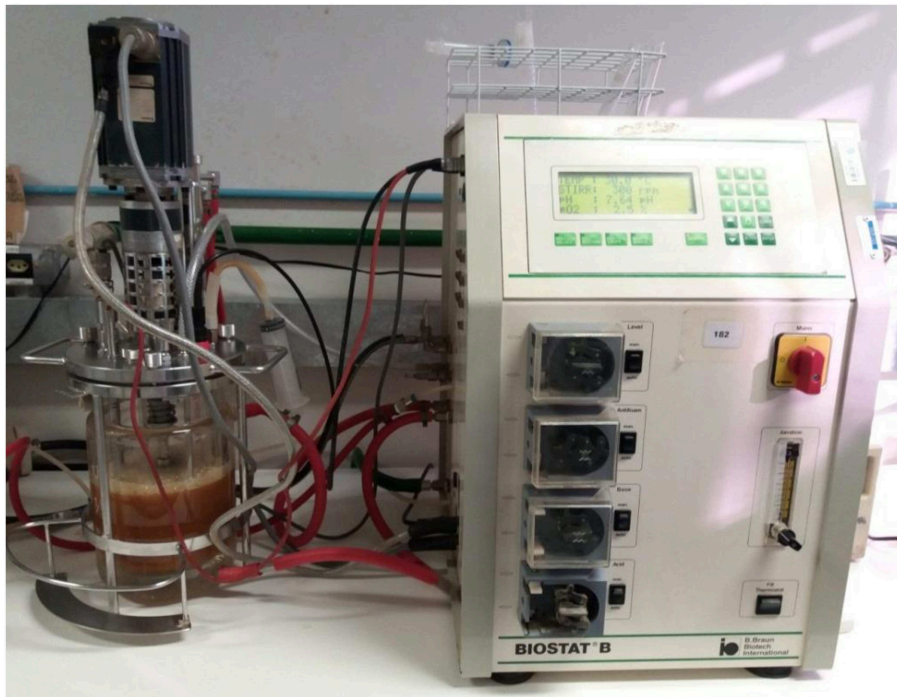


Figura 3.4 - Fermentador Biostat B

3.1.7.2 Unidade experimental para extração da β -galactosidase

Para extração da enzima β -galactosidase foi utilizado um processador ultrassônico com frequência de 20 kHz e potência máxima de 150 W, dotado de uma micro ponteira de titânio (Mp) como mostrado na Figura 3.5.



Figura 3.5 - Processador Ultrassônico

3.1.7.3 Unidade experimental para determinação da atividade enzimática

Para determinação da atividade enzimática da enzima solúvel foi utilizado um reator de mistura operado em batelada, com volume útil de 200 mL, que possui uma camisa externa para circulação de água proveniente de banho termostaticado para controle da temperatura, submetido à agitação magnética. O reator de mistura apresentava as dimensões de 8,2 cm de altura e 5,5 cm de diâmetro interno (Figura 3.6).



Figura 3.6 - Unidade Experimental para determinação da atividade enzimática para enzima solúvel

Para a atividade das enzimas imobilizadas foram utilizados reatores bateladas tipo cesta com dimensões de 8,2 cm de altura e 5,5 cm de diâmetro interno, sendo compostos por cestas de aço inox de 100 mesh que eram colocadas dentro dos reatores com volume útil de 200 mL. As cestas evitaram o atrito entre as partículas de enzimas imobilizadas e o agitador (Figura 3.7).



Figura 3.7 - Unidade Experimental para determinação da atividade enzimática da enzima imobilizada

Para maior agilidade na execução dos experimentos, três reatores foram montados em série utilizando o mesmo banho termostático, tanto para determinação da atividade enzimática da enzima solúvel quanto para enzima imobilizada.

3.2 METODOLOGIA

3.2.1 Fermentação da *K.marxianus* para produção da β -galactosidade

. A fermentação foi conduzida em condições controladas de temperatura a 30 °C, agitação de 300 rpm, aeração 1 vvm no tempo de 24 horas, as condições foram definidas de acordo com a otimização realizada por Falleiros, 2016.

A unidade experimental utilizada foi descrita no item 3.1.7.1, para a fermentação o volume útil que foi usado do reator foi de 1,5 L.

3.2.2 Extração da enzima

A extração foi realizada a partir de uma suspensão celular da levedura *K. marxianus* ATCC 46537. O caldo fermentado foi centrifugado, em centrífuga da marca Beckman Coulter modelo Avanti Centrifuge J-25 (27 200 g, 10 minutos), o decantado foi ressuspensionado em tampão fosfato de sódio 0,2 M pH 7,3 para obter uma suspensão celular com 2,62 mg.mL⁻¹ (NUMANOGLU; SUNGUR, 2004; MANERA et al., 2008).

Para extração da enzima intracelular β -galactosidase de *K. marxianus* foi utilizado rompimento ultrassônico em um processador ultrassônico (descrito no item 3.1.6.2) 20 kHz e potência máxima de 150 W usando uma micro ponteira de titânio (Mp) a 40% de potência. A suspensão celular foi submetida a 30 minutos de pulsos ultrassônicos (tempo total do processo de 60 minutos), com substituição do banho de gelo a cada 10 minutos (LEMES et al., 2012).

Para obtenção do extrato enzimático clarificado, a suspensão celular obtida após cada processo de ruptura, foi centrifugada (27 200 g, 10 minutos) e o sobrenadante utilizado para determinar a atividade enzimática.

O Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) foi utilizado para realizar a análise microestrutural da levedura *K. marxianus*. Sendo, o MEV Carl Zeiss, model EVO MA 10. Energy dispersive spectroscopy (EDS, Oxford, model 51- ADD0048).

A análise de *K. marxianus* foi feita utilizando a levedura antes e após a ruptura celular. Amostras de 30 mL do meio fermentado foram retiradas do reator durante a fermentação e centrifugadas por 10 min a 8000 rpm, em seguida o decantado foi congelado e liofilizado em liofilizador Liotop L101 por 24 horas. O mesmo foi realizado para o extrato

enzimático após a ruptura. Após a liofilização as amostras foram colocadas nos *stubs*, metalizadas em banho de ouro e visualizadas no MEV.

3.2.3 Determinação da atividade enzimática

O método das taxas iniciais da reação de hidrólise da lactose foi utilizado para determinar a atividade enzimática da enzima β -galactosidase de *K. marxianus* ATCC 46537, na sua forma solúvel e imobilizada. Foi realizado em reator de mistura em operação batelada utilizando um volume de 75 mL de solução 50 g L⁻¹ de lactose (PA), preparado em tampão láctico pH 6,5, a 30 °C conforme descrito por Santiago et al. (2004). Em cada experimento era adicionada ao reator 5 mL do sobrenadante obtido após processo de extração da enzima para determinar a atividade da enzima solúvel, já para enzima imobilizada era adicionado uma cesta de aço inox contendo 0,5 g de enzima imobilizada.

A unidade de atividade (U) foi definida como μmol de glicose por minuto ($\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$). Para cada experimento foram retiradas cinco amostras do meio reacional no intervalo de cinco em cinco minutos (5, 10, 15, 20 e 25 min). As amostras obtidas eram colocadas em tubos de ensaio, que eram tampados e colocados diretamente em banho de água em ebulição, por 10 minutos. O método da glicose-oxidase foi utilizado para dosar a glicose formada (BAO et al., 2004). O teste foi realizado utilizando o kit Glicose Liquiform da Labtest conforme Apêndice A.

A atividade era obtida da inclinação das equações lineares de concentração de glicose em função do tempo, usando o método das taxas iniciais da reação de hidrólise da lactose. Os experimentos foram realizados em duplicata com intuito de agregar maior confiabilidade aos resultados obtidos.

3.2.4 Determinação da concentração celular

A concentração celular foi determinada a partir da absorbância a 650 nM, convertida em massa seca de células utilizando a curva padrão de biomassa seca em função da absorbância que é representada no Apêndice B.

3.2.5 Determinação das concentrações de lactose e etanol

As concentrações de lactose e etanol foram determinadas por cromatografia líquida de alta eficiência. A amostra foi diluída, filtrada e injetada no sistema cromatográfico, HPLC (High Performance Liquid Chromatography), marca Shimadzu modelo LC-20A Prominence, coluna SUPELCOGEL C-610H. Empregou-se como fase móvel ácido fosfórico (0,1%), com fluxo de 0,5 mL.min, temperatura do forno a 32°C e volume de injeção de 20 µL. As concentrações de lactose e etanol foram calculados com auxílio de curvas padrão realizadas previamente.

3.3 CARACTERIZAÇÃO DA β -GALACTOSIDASE SOLÚVEL

3.3.1 Estudo da estabilidade térmica da β -galactosidase solúvel

Amostras dos extratos enzimáticos obtidos das fermentações, segundo procedimento descrito no item 3.2.1, foram incubadas em banho termostático a diferentes temperaturas. As condições avaliadas foram: 30 °C (24 horas), 35 °C (12 horas), 40 °C (4 horas) e 50 °C (2 horas). As amostras foram coletadas ao longo do tempo e rapidamente arrefecidas em banho de gelo, em seguida a atividade enzimática foi determinada de acordo com o item 3.2.3. Os resultados da atividade enzimática residual em função do tempo de incubação, para cada temperatura foram ajustados para os modelos de desativação térmica de primeira ordem (Equação 3.1) e por modelagem de desativação térmica com um estágio (Equação 3.2). Os ajustes foram realizados pelo método numérico Levenberg-Marquardt usando o software Statistica 7.0, determinando os parâmetros cinéticos por meio dos melhores ajustes (HENLEY; 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 etapa e a atividade inicial (E);

k_d = constante cinética de desativação térmica

Para cada temperatura foram determinados os tempos de meia vida, sendo assim foi possível considerar o melhor ajuste dos dados experimentais às equações de desativação térmica para cada temperatura (3.1 e 3.2) utilizando as Equações 3.3 e 3.4, para os modelos de desativação térmica e desativação térmica com um estágio, respectivamente. A energia de ativação da desativação térmica foi calculada pela equação de Arrhenius linearizada (Equação 3.5).

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

$$t_{\frac{1}{2}} = -\frac{1}{k_d} \ln\left(\frac{\frac{A}{A_0} - \alpha_1}{1 - \alpha_1}\right) \quad (3.4)$$

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

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

3.3.2 Estudo da estabilidade da β -galactosidase solúvel em relação ao pH

As amostras do extrato enzimático bruto foram liofilizadas em liofilizador Liotop L101 e armazenadas a -15°C até a utilização. Foram preparadas soluções tampão fosfato de

sódio 0,2 M em diferentes valores de pH, sendo eles: 6,0; 6,5; 7,0; 7,3; 7,5 e 8,0. As amostras liofilizadas foram ressuspensas nas diferentes soluções tampão e incubadas em banho termostático a 30°C por 12 horas. Em seguida, as amostras foram retiradas e a atividade enzimática foi avaliada conforme o item 3.2.3. A atividade residual foi calculada relativa, tendo como 100% a atividade da enzima sem tratamento.

3.3.3 Estabilidade ao armazenamento da β -galactosidase solúvel

A enzima obtida pela *K. marxianus* foi armazenada durante sete semanas em duas condições diferentes. Foi armazenada na forma líquida sob refrigeração a 10 °C e a enzima também foi liofilizada em liofilizador Liotop L101 por 24 horas e em seguida mantida sob congelamento a -15 °C. As amostras foram analisadas semanalmente e determinada a atividade enzimática. A atividade enzimática foi determinada pelo método das taxas iniciais, conforme o item 3.2.3. A atividade residual foi calculada relativa, tendo como 100% a atividade da enzima sem tratamento.

3.4 IMOBILIZAÇÃO DA β -GALACTOSIDASE

3.4.1 Ativação do Suporte

Para ativação da resina Duolite[®] A568 foi utilizado a metodologia proposta pelo fabricante: ácido clorídrico 1 M, na razão de dez volumes de solução por volume de resina, por 30 minutos em incubadora rotativa a 50 rpm. Em seguida foi adicionado hidróxido de sódio 1 M, nas mesmas condições do procedimento realizado com o ácido. Entre os tratamentos a resina foi lavada com água destilada. Ao fim do processo a resina foi lavada com água destilada, filtrada a vácuo durante 15 minutos e seca a temperatura ambiente. Para regeneração do suporte para nova utilização foi usado o mesmo procedimento descrito.

3.4.2 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 o item 3.4.1, foi incubada em solução enzimática extraída por rompimento

ultrassônico com concentração definida a cada experimento, a solução foi preparada em tampão fosfato de sódio variando o pH a depender da análise. As amostras foram mantidas sob agitação de 150 rpm em incubadora rotatória a $25\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ por tempo determinado em cada análise. As condições de imobilização empregadas em relação a temperatura, agitação e massa de resina foram seguidas de acordo com as condições propostas por Falleiros et al., (2017).

O Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) foi utilizado para realizar a análise microestrutural da resina Duolite A-568. Sendo, o MEV Carl Zeiss, model EVO MA 10. Energy dispersive spectroscopy (EDS, Oxford, model 51- ADD0048). A resina Duolite® A-568 (previamente ativada conforme item 3.4.1) foi avaliada antes da imobilização da enzima β -galactosidase.

3.4.3 Atividade recuperada da imobilização da β -galactosidase

Para todas as imobilizações foi calculada a atividade recuperada (AR) definida como uma razão entre a atividade observada na enzima imobilizada sobre a atividade da enzima solúvel inicial. A unidade utilizada nos cálculos foi U ($\mu\text{mol de glicose} \cdot \text{min}^{-1}$), considerando que para todos os experimentos de imobilização foi utilizado uma massa de 0,5 g de resina Duolite® A-568. A atividade recuperada mostrada na Equação 3.6., foi definida como descrita no trabalho de Sheldon e Van Petl, (2013)

$$AR(\%) = \frac{\text{atividade observada}}{\text{atividade inicial da enzima solúvel}} \times 100 \quad (3.6)$$

3.5 TESTES PRELIMINARES DE IMOBILIZAÇÃO DA β -GALACTOSIDASE

Para definir as condições de imobilização satisfatórias para a enzima β -galactosidase de *K. marxianus*, foram realizados testes preliminares variando tempo, volume de enzima, concentração enzimática e utilização de enzima liofilizada na imobilização. Para todos os experimentos utilizou-se uma massa fixa de resina de 0,5 g.

As condições de imobilização em todos os experimentos foram realizadas conforme o item 3.4.2. As atividades enzimáticas foram calculadas pelo método das taxas iniciais da reação de hidrólise, item 3.2.3, a atividade recuperada das imobilizações foi calculada de acordo com item 3.4.3.

3.5.1 Avaliação da estabilidade da β -galactosidase solúvel nas condições de imobilização

Para avaliar a atividade da enzima solúvel nas condições de imobilização definidas no item 3.4.2, foi realizado um experimento. O extrato enzimático foi mantido nas condições de 150 rpm e 25 °C durante 24 horas, amostras foram avaliadas em diferentes tempo.

3.5.2 Avaliação do tempo de imobilização da β -galactosidase

Inicialmente foi realizado o teste de tempo utilizando 10 mL de extrato enzimático de acordo com Falleiros et al., (2017). O tempo de imobilização foi avaliado em 1 hora, 3 horas e 15 horas.

3.5.3 Avaliação do volume de extrato enzimático para imobilização da β -galactosidase

Com o tempo definido pelos testes preliminares conforme o item 3.5.1, variou-se o volume de enzima ofertada durante a imobilização. Os volumes avaliados foram 10, 15, 20, 30, 40 e 50 mL de extrato enzimático.

3.5.4 Avaliação da atividade ofertada da enzima para imobilização da β -galactosidase

Pela avaliação do volume (item 3.5.2) as concentrações foram definidas para os respectivos volumes estudados e estas condições foram avaliadas para imobilização da β -galactosidase.

3.5.5 Avaliação da imobilização da enzima β -galactosidase liofilizada

As amostras da enzima β -galactosidase foram liofilizadas em liofilizador Liotop L101 por 24 horas. Em seguida foram ressuspensas em metade do volume utilizado na liofilização no tampão fosfato de sódio 0,2 M no pH 7,3. Com esses extratos enzimáticos foram realizadas as imobilizações. Inicialmente foram feitos testes ofertando diferentes

volumes (5, 7 e 10 mL de extrato enzimático liofilizado). Em seguida foram reproduzidas as condições de concentrações obtidas com o extrato enzimático solúvel sem liofilização (item 3.5.3). Após definidas as condições satisfatórias de imobilização de concentração enzimática realizou-se uma reavaliação do tempo com o extrato liofilizado. As amostras foram imobilizadas durante 3 horas, sendo que a cada 30 minutos, retirava-se uma amostra para análise. Os experimentos foram realizados em duplicata para maior confiabilidades dos resultados.

3.6 OTIMIZAÇÃO DA IMOBILIZAÇÃO DA β -GALACTOSIDASE DE *Kluyveromyces marxianus*

Para análise da imobilização da β -galactosidase de *K. marxianus* foi estudada a influência de três variáveis selecionadas a partir dos experimentos preliminares e resultados da literatura por um Planejamento Composto Central (PCC) e a resposta estudada foi a atividade recuperada do biocatalisador.

O PCC foi realizado com dois níveis originais, usando o software Statistica 7.0, tendo 2^3 pontos fatoriais, 6 pontos axiais e 3 repetições no ponto central, totalizando dezessete experimentos.

O pH do extrato enzimático variou de 6,46 a 8,14, a concentração do tampão e a atividade ofertada variaram de 0,1 a 1,5 M e 18,59 a 35,40 U, respectivamente. O tampão utilizado nos testes foi o fosfato de sódio nos diferentes valores de pH e concentração do tampão. O alfa de ortogonalidade utilizado neste planejamento experimental foi de 1,67332.

Os níveis das variáveis estudadas foram colocados na forma codificada (adimensionalizada), usando a equação geral de codificação (Equação 3.7). As equações codificadas para pH (X_1), concentração do tampão (X_2) e atividade ofertada (X_3) são mostradas nas Equações 3.8; 3.9; 3.10, respectivamente.

$$X_n = \frac{(X - X_0)}{\frac{X_{+1} - X_{-1}}{2}} \quad (3.7)$$

Sendo:

X_n o valor da variável no experimento na forma codificada; X é o valor real da variável a ser calculada; X_0 é o valor real da variável no ponto central; X_{+1} é o valor real da variável no nível superior; X_{-1} é o valor real da variável no nível inferior.

$$X_1 = \frac{([pH]-7,30)}{0,5} \quad (3.8)$$

$$X_2 = \frac{([Concentração\ do\ tampão]-0,8)}{0,4} \quad (3.9)$$

$$X_3 = \frac{([Atividade\ ofertada]-27)}{5} \quad (3.10)$$

Na Tabela 3.6 podem ser vistos os valores que foram utilizados no planejamento experimental para as três variáveis independentes analisadas.

Tabela 3.6 - Valores reais e codificados utilizados no Planejamento Composto Central

Valores Codificados	pH (X_1)	Concentração do Tampão (M) (X_2)	Atividade Ofertada(U) (X_3)
$-\alpha$	6,46	0,10	18,59
-1	6,80	0,40	22,00
0	7,30	0,80	27,00
1	7,80	1,20	32,00
$+\alpha$	8,14	1,50	35,41

As faixas iniciais de pH e concentração do tampão foram determinadas segundo Campello et al., (2012) e a atividade ofertada foi definida com base nos testes preliminares de imobilização da β -galactosidase.

A Tabela 3.7 mostra a matriz do PCC com os valores codificados e originais das variáveis estudadas. Os ensaios foram realizados de forma aleatória, com intuito de evitar a tendenciosidade dos resultados.

Tabela 3.7 - Matriz do PCC com os valores codificados e originais das variáveis

Experimentos	pH (X ₁)	Concentração do Tampão (M) (X ₂)	Atividade Ofertada (U) (X ₃)
1	6,80 (-1)	0,40 (-1)	22,00 (-1)
2	6,80 (-1)	0,40 (-1)	32,00 (+1)
3	6,80 (-1)	1,20 (+1)	22,00 (-1)
4	6,80 (-1)	1,20 (+1)	32,00 (+1)
5	7,80 (+1)	0,40 (-1)	22,00 (-1)
6	7,80 (+1)	0,40 (-1)	32,00 (+1)
7	7,80 (+1)	1,20 (+1)	22,00 (-1)
8	7,80 (+1)	1,20 (+1)	32,00 (+1)
9	6,46 (- α)	0,80 (0)	27,00 (0)
10	8,14(+ α)	0,80 (0)	27,00 (0)
11	7,30 (0)	0,10 (- α)	27,00 (0)
12	7,30 (0)	1,50 (+ α)	27,00 (0)
13	7,30 (0)	0,80 (0)	18,59 (- α)
14	7,30 (0)	0,80 (0)	35,41 (+ α)
15	7,30 (0)	0,80 (0)	27,00 (0)
16	7,30 (0)	0,80 (0)	27,00 (0)
17	7,30 (0)	0,80 (0)	27,00 (0)

3.7 IMOBILIZAÇÃO COM A ENZIMA COMERCIAL

Utilizou-se a enzima β -galactosidase produzida pela levedura *K. lactis*, Lactozyme[®] 2600 adquirida comercialmente da empresa Sigma Chemical CO (Sigma-Aldrich), disponível na forma de líquida com concentração superior a 2600 U.g⁻¹ e alta pureza. A enzima foi imobilizada nas condições de imobilizações descritas no item a 3.4.2 e com atividade ofertada de 27 U e 54 U. A atividade enzimática foi calculada conforme o item 3.2.3.

3.8 IMOBILIZAÇÃO EM SÉRIE DA ENZIMA β -GALACTOSIDASE

Com intuito de melhorar a atividade da enzima imobilizada, foram realizados testes com duas imobilizações, com objetivo de realizar uma pré-purificação na primeira etapa e a imobilização na segunda etapa. Dessa forma, foi utilizado 0,5 g de resina Duolite[®] A-568 para uma quantidade de extrato enzimático já definido e realizou-se a imobilização de acordo com

o item 3.4.2 em um tempo de 30 minutos, após a primeira imobilização a resina foi separada do sobrenadante. O sobrenadante resultante da primeira imobilização foi novamente ofertado a uma nova resina com mesma massa (0,5 g), a segunda imobilização foi realizada sob as mesmas condições, porém em um tempo de 1 hora. As resinas das duas etapas foram lavadas (separadamente) com tampão fosfato de sódio 0,8 M a pH 7,3 e a atividade enzimática do biocatalisador obtido em cada etapa foi determinada conforme o item 3.2.3.

3.9 TESTES PRELIMINARES DA RETICULAÇÃO COM GLUTARALDEÍDO

O processo de ligação cruzada utilizou glutaraldeído como agente reticulante na razão de 1:10 (1 g de resina para 10 mL de solução de glutaraldeído). A solução de glutaraldeído utilizada foi preparada em tampão fosfato de sódio 0,8 M, pH 7,3. Para reticulação variou a concentração de glutaraldeído em 0,14; 0,35 e 3,5 g.L⁻¹. Adicionou-se 5 mL de solução de glutaraldeído à 0,5 g de resina imobilizada com a β -galactosidase e manteve-se o sistema sob agitação de 150 rpm e temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ por 1,5 horas. Foi realizado também a estabilidade a duas horas à 30 °C da amostra reticulada, em seguida foi determinada a atividade enzimática de acordo com o item 3.2.3.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo serão apresentados e discutidos os principais resultados obtidos no desenvolvimento deste trabalho. Primeiramente são apresentados os resultados da produção da β -galactosidase a partir da fermentação submersa com *K. marxianus*, em seguida a enzima foi caracterizada em sua forma solúvel quanto a estabilidade térmica, estabilidade ao pH, estabilidade à liofilização e estabilidade ao armazenamento. Depois serão apresentados e discutidos os resultados dos testes preliminares da imobilização da enzima β -galactosidase em resina Duolite[®] A-568, as seguintes variáveis foram avaliadas em relação à atividade recuperada da imobilização da enzima: tempo de imobilização, volume e atividade ofertada na imobilização e imobilização com a enzima liofilizada. Após as variações da imobilização serão discutidos os resultados obtidos da otimização da imobilização realizada por um Planejamento Composto Central que exibiu como variáveis pH, concentração do tampão de imobilização e atividade ofertada da enzima. Também serão expostos os resultados da imobilização da enzima comercial *K. lactis* Lactozyme[®] 2600. Em seguida os resultados obtidos da imobilização em série da enzima β -galactosidase são apresentados e discutidos. Em por fim serão discutidos os resultados experimentais da reticulação com glutaraldeído em diferentes concentrações do biocatalisador imobilizado.

4.1 CINÉTICA DE FERMENTAÇÃO PARA PRODUÇÃO DA β -GALACTOSIDASE A PARTIR DE *Kluyveromyces marxianus* ATCC 46537

Nas Figuras 4.1 a 4.3 podem ser observados os resultados médios referentes à cinética de fermentação. São ilustradas a atividade da enzima, biomassa, pH, lactose e etanol. As condições utilizadas foram otimizadas por Falleiros, 2016 (300 rpm e 1,0 vvm) na fermentação da *K. marxianus* ATCC 46537 para produção da β -galactosidase.

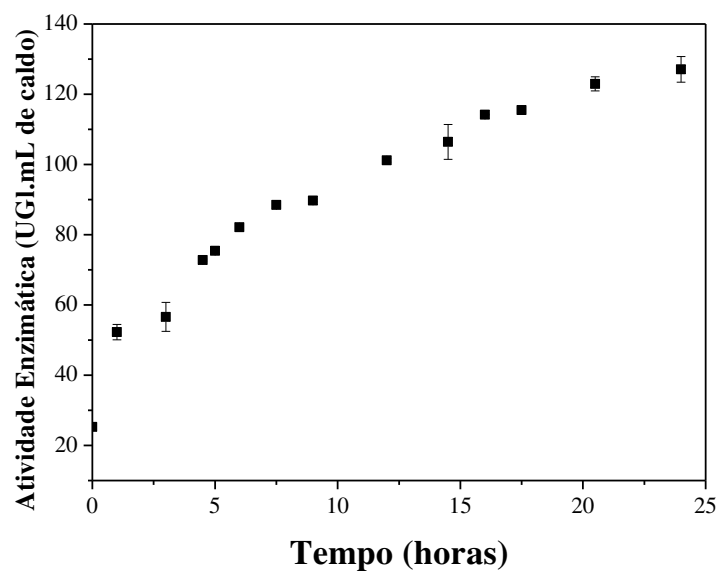


Figura 4.1 - Perfil de atividade enzimática durante a fermentação nas condições utilizadas (300 rpm e 1 vvm) para produção de β -galactosidase de *K. marxianus*.

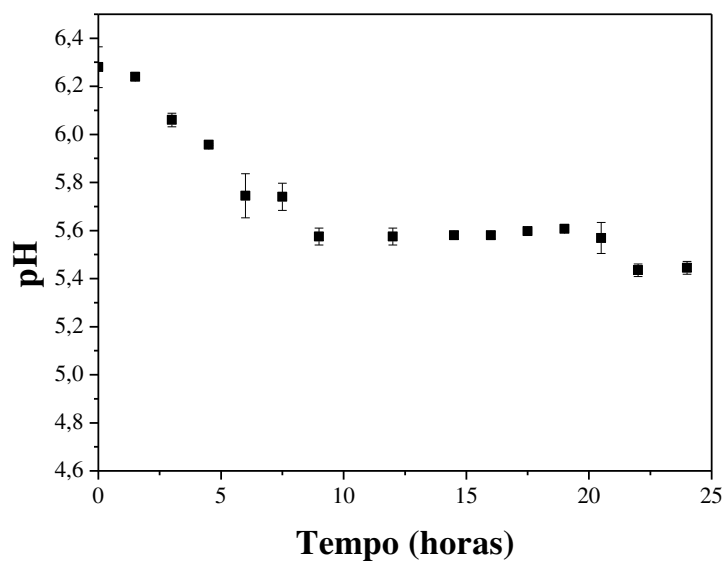


Figura 4.2 - Variação do pH durante a fermentação nas condições utilizadas (300 rpm e 1 vvm) para produção de β -galactosidase de *K. marxianus*.

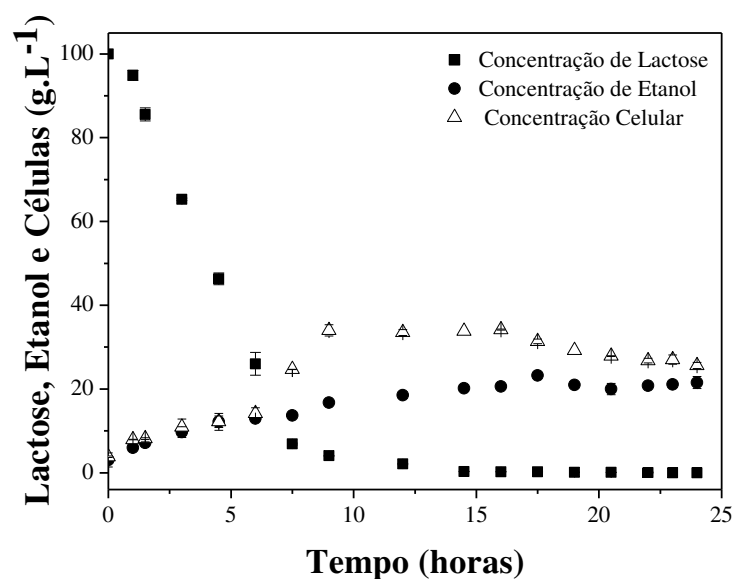


Figura 4.3 - Perfil de concentração de lactose, etanol e biomassa durante a fermentação cinética nas condições utilizadas (300 rpm e 1 vvm) para produção de β -galactosidase de *K. marxianus*.

Nas condições utilizadas os valores obtidos para atividade da enzima, biomassa, pH, lactose e etanol foram de acordo com o esperado conforme Falleiros, 2016. A maior atividade enzimática foi de 127,09 UGl.mL caldo⁻¹ no tempo de 24 horas. O pH sofreu leve decréscimo com o decorrer do tempo de fermentação alcançando um valor final de aproximadamente 5,3. A concentração de lactose chegou à zero após 15 horas de fermentação e a concentração de etanol aumentou até 18 horas de fermentação, após esse tempo foi observado um decréscimo de cerca de 2 g.L⁻¹ nos tempos finais o que pode ser justificado pelas perdas para o ambiente, evaporação.

4.2 EXTRAÇÃO DA ENZIMA β -GALACTOSIDASE

Após a fermentação da levedura *K. marxianus* foi realizada a extração da enzima β -galactosidase, por meio da ruptura com processador ultrassônico foi possível obter o extrato enzimático bruto, a atividade média dos extratos produzidos pelas fermentações foi de aproximadamente 5,0 U.

Foi feito a visualização da levedura *K. marxianus* no MEV utilizando a levedura antes e após a ruptura celular. A Figura 4.4 ilustra o MEV da levedura antes da ruptura A) 10 μ m e B) 1 μ m.

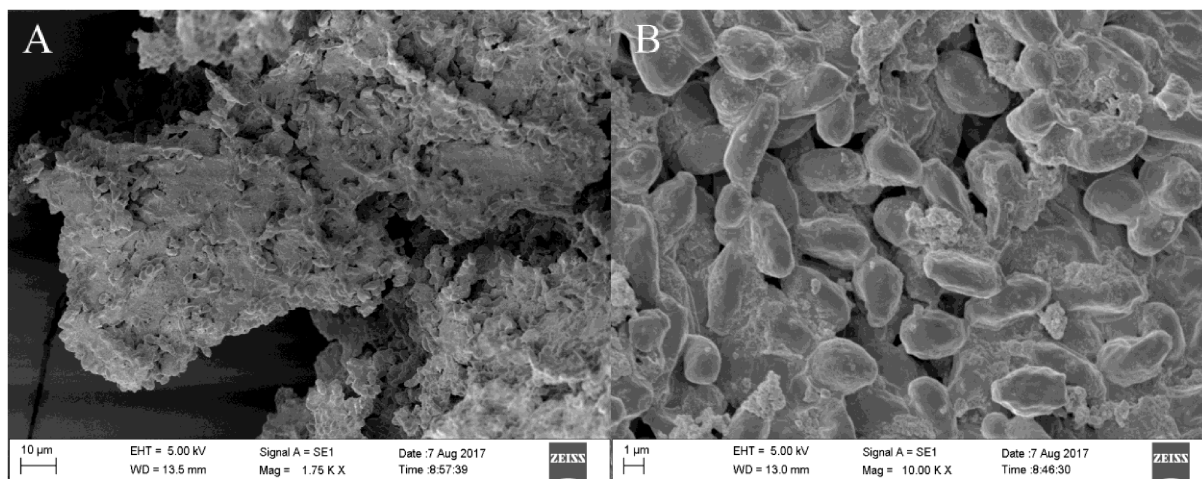


Figura 4.4 - Levedura *Kluyveromyces marxianus* antes da ruptura A) 1,75 K X e B) 10.000 K X

As Figuras 4.4 A e 4.4 B foram capazes de mostrar a estrutura da levedura *K. marxianus* destacando sua forma de bastonete.

Na Figura 4.5 é possível observar o MEV da levedura *K. marxianus* em A) 10 µm e B) a 1µm, respectivamente.

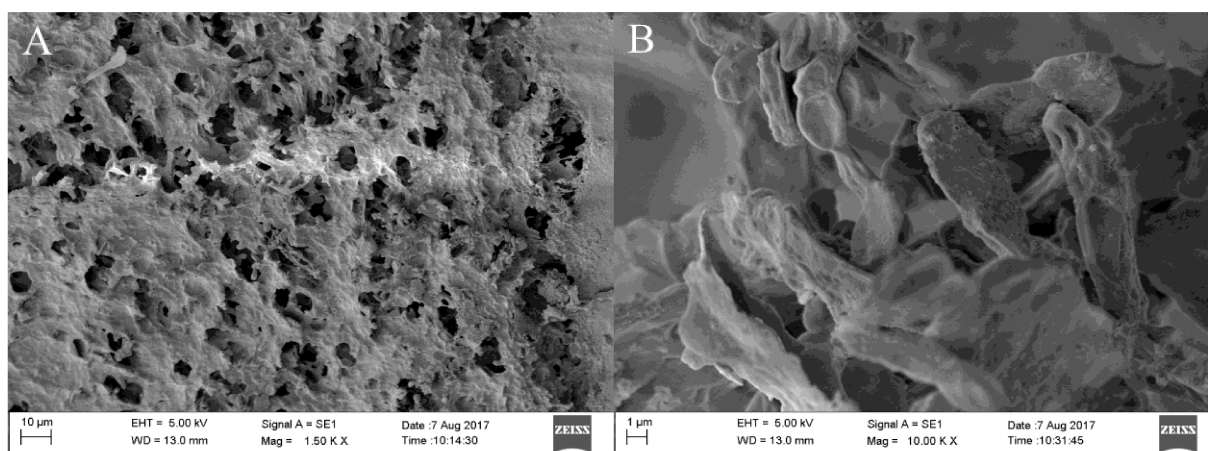


Figura 4.5 - Levedura *Kluyveromyces marxianus* após a ruptura pelo processador ultrassônico A) 1,50 K X e B) 10.00 K X

Pelas imagens do MEV foi possível observar a estrutura rompida da levedura *K. marxianus* concluindo assim que o processador ultrassônico foi capaz de realizar a ruptura das células. A forma de bastonete observadas na Figura 4.4 (antes da ruptura) foi completamente modificada.

4.3 CARACTERIZAÇÃO DA β -GALACTOSIDASE SOLÚVEL

4.3.1 Estudo da estabilidade térmica da β -galactosidase solúvel

As atividades relativas em função do tempo de incubação estão ilustradas na Figura 4.6, que mostra que a temperatura exerce uma grande influência sobre a estabilidade da β -galactosidase produzida a partir da *K. marxianus*.

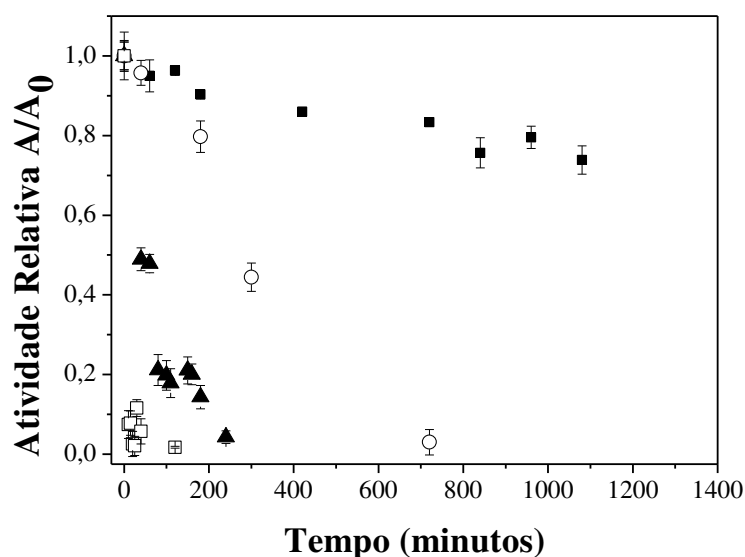


Figura 4.6 - Perfis de inativação térmica para β -galactosidase imobilizada em ■ 30 °C; ○ 35 °C; ▲ 40 °C; □ 50 °C.

Na Figura 4.6 pode ser observado que para temperaturas de 40 e 50 °C houve uma redução significativa de atividade, maior que 80%, logo após uma hora de incubação. Para 35 °C a inativação enzimática foi um pouco mais lenta, a enzima sofreu inativação térmica somente após 12 horas de incubação, em 5 horas a perda de atividade foi cerca de 60% em relação à atividade inicial, contudo para 30 °C a enzima manteve cerca de 80% de sua atividade inicial após 24 horas de incubação. Como foi observado, o processo de inativação térmica é maior com o aumento de temperatura, em temperaturas mais baixas a enzima apresenta maior resistência quanto à perda de atividade.

Os resultados da atividade enzimática residual deste trabalho em função do tempo de incubação, para cada temperatura, foram ajustados aos modelos de desativação térmica de primeira ordem (Equação 3.1), e pelo modelo de desativação enzimática com um estágio (Equação 3.2). Os ajustes foram realizados pelo método numérico de Levenberg-Marquardt,

usando o software Statistica[®] 7.0, para determinar os parâmetros cinéticos pelos melhores ajustes (MORÉ, 1977; HENLEY; SADANA, 1985).

Na Tabela 4.1 são apresentados os coeficientes de determinação para cada equação, a soma dos quadrados dos desvios, com os 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%.

Tabela 4.1 - Ajuste dos dados experimentais aos modelos de desativação térmica de primeira ordem e em um estágio para β -galactosidase solúvel

T (°C)	Equação	k_d	Valor -p	R^2	$\sum(V-V_{mod.})^2$	α_1	Valor -p
30	3.1	0,000286	0,000000	0,91	0,000821	-	-
30	3.2	0,000529	0,000001	0,92	0,000716	0,40	0,000000
35	3.1	0,002498	0,007072	0,93	0,047183	-	-
35	3.2	0,000750	0,389567	0,98	0,016383	-1,36	0,520469
40	3.1	0,014433	0,000001	0,93	0,045659	-	-
40	3.2	0,019363	0,000236	0,96	0,030113	0,10	0,043655
50	3.1	0,225803	0,001574	0,97	0,020141	-	-
50	3.2	0,353965	0,046617	0,99	0,007502	0,05	0,015728

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

De acordo com os resultados obtidos pela modelagem de desativação térmica nas temperaturas avaliadas, verifica-se que o modelo de desativação térmica de primeira ordem (Equação 3.1) se ajustou para todas as temperaturas. Entretanto, o modelo de desativação térmica com um estágio foi eficiente para o ajuste dos resultados relativos às temperaturas de 30, 40 e 50 °C.

Os resultados experimentais de atividade relativa e os preditos pelos dois métodos são comparados nas Figuras 4.7 a 4.10. As Equações 4.1 a 4.4 mostram os parâmetros ajustados para cada temperatura.

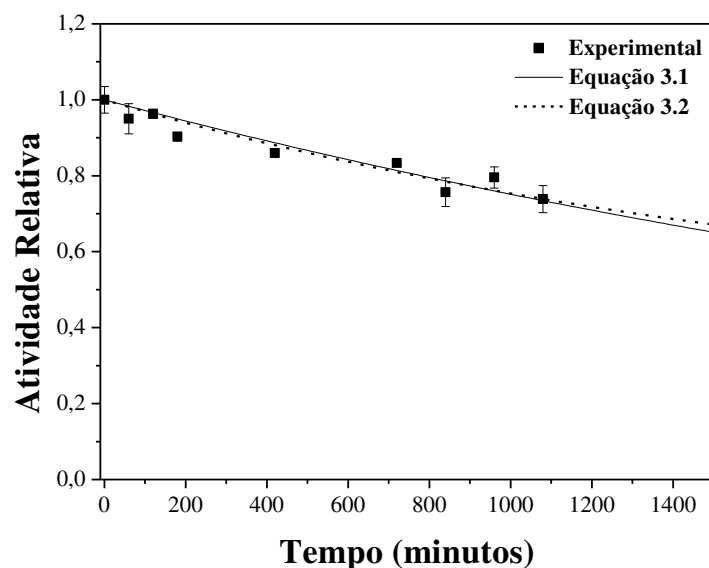


Figura 4.7 - Perfil de inativação térmica a 30°C e pH 7,3 (tampão fosfato de sódio 0,2 M) para imobilização de β -galactosidase. Ajuste de modelo matemático aos dados experimentais: (—) Equação 3.1=modelo de desativação térmica de primeira ordem; (---) Equação 3.2=modelo de desativação térmica com um estágio.

Observando a Figura 4.7 verifica-se um bom ajuste entre os valores experimentais e teóricos ao modelo de desativação térmica de primeira ordem com coeficiente de correlação de 0,91 e a soma dos quadrados dos desvios igual a 0,000821. Os dois modelos de desativação térmica se ajustaram aos resultados experimentais, entretanto o coeficiente de correlação do modelo de desativação térmica com um estágio foi maior, sendo 0,92 e a soma dos quadrados dos desvios de 0,000716, dessa forma esse foi o modelo escolhido para ajustar os resultados. O parâmetro ajustado ao modelo de desativação térmica de primeira ordem com um estágio está representado na Equação 4.1.

$$\frac{A}{A_0} = (1 - 0,4) \cdot e^{(-0,000208 \times t)} + 0,4 \quad (4.1)$$

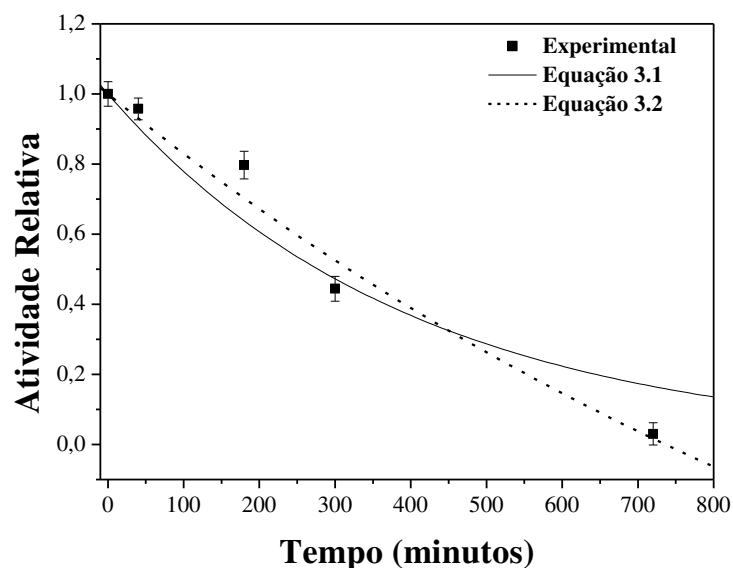


Figura 4.8 - Perfil de inativação térmica a 35°C e pH 7,3 (tampão fosfato de sódio 0,2 M) para imobilização de β -galactosidase. Ajuste de modelo matemático aos dados experimentais: (—) Equação 3.1=modelo de desativação térmica de primeira ordem; (···) Equação 3.2=modelo de desativação térmica com um estágio.

A Figura 4.8 ilustra o bom ajuste entre os valores experimentais e teóricos para o modelo de desativação térmica de primeira ordem com o coeficiente de determinação igual a 0,93 e a soma dos quadrados dos desvios igual a 0,047183. O modelo de desativação térmica de primeira ordem com um estágio também se ajustou bem aos valores experimentais, apresentando um coeficiente de determinação até maior, sendo 0,98, contudo o valor de $p > 0,10$ e o α_1 foi negativo, assim o modelo foi inviável para ajuste dos resultados. O parâmetro ajustado ao modelo de desativação de primeira ordem está representado na Equação 4.2.

$$\frac{A}{A_0} = e^{(-0,002498 \times t)} \quad (4.2)$$

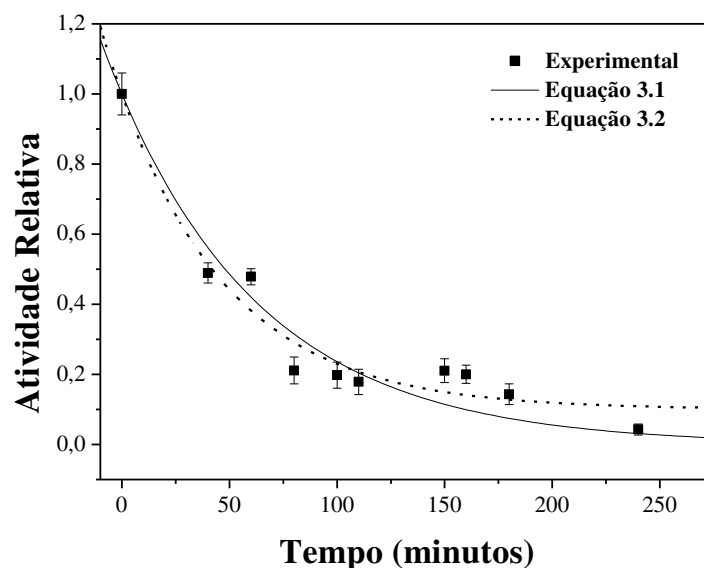


Figura 4.9 - Perfil de inativação térmica a 40°C e pH 7,3 (tampão fosfato de sódio 0,2 M) para imobilização de β -galactosidase. Ajuste de modelo matemático aos dados experimentais: (—) Equação 3.1=modelo de desativação térmica de primeira ordem; (⋯) Equação 3.2=modelo de desativação térmica com um estágio.

A partir dos dados apresentados na Figura 4.9 é possível observar o bom ajuste entre os valores experimentais e teóricos aos dois modelos de desativação térmica, contudo o coeficiente de determinação do modelo de desativação térmica de primeira ordem com um estágio foi maior sendo igual a 0,96 e a soma dos quadrados dos desvios 0,030113, enquanto para o modelo de desativação térmica de primeira ordem o coeficiente foi 0,93 e a soma dos quadrados dos desvios foi de 0,045659. O parâmetro ajustado ao modelo de desativação de primeira ordem com um estágio é representado na Equação 4.3.

$$\frac{A}{A_0} = (1 - 0,100354) \cdot e^{(-0,019363 \times t)} + 0,100354 \quad (4.3)$$

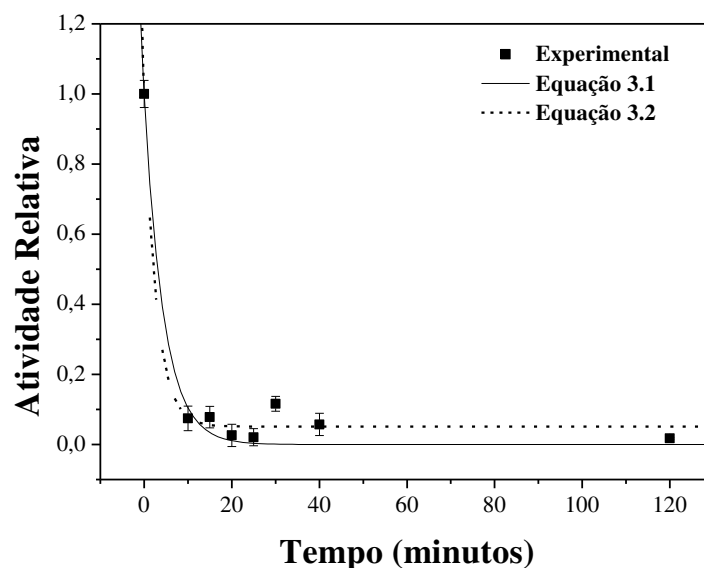


Figura 4.10 - Perfil de inativação térmica a 50°C e pH 7,3 (tampão fosfato de sódio 0,2 M) para imobilização de β -galactosidase. Ajuste de modelo matemático aos dados experimentais: (—) Equação 3.1=modelo de desativação térmica de primeira ordem; (···) Equação 3.2=modelo de desativação térmica com um estágio.

De acordo com a Figura 4.10 pode-se verificar o ótimo ajuste dos resultados experimentais e teóricos ao modelo de desativação térmica de primeira ordem com um estágio com o coeficiente de determinação igual a 0,99 e a soma dos quadrados dos desvios igual a 0,007502. O modelo de desativação térmica de primeira ordem com um estágio também apresentou um ótimo ajuste, entretanto o coeficiente de determinação foi menor de 0,97 e a soma dos quadrados foi de 0,020141. O parâmetro ajustado ao modelo de desativação de primeira ordem com um estágio está representado na Equação 4.4.

$$\frac{A}{A_0} = (1 - 0,050949) \cdot e^{(-0,353965 \times t)} + 0,05094 \quad (4.4)$$

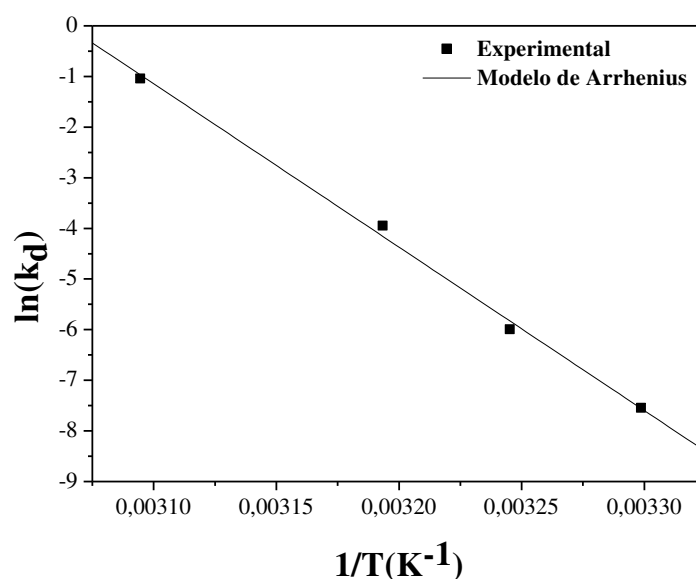
Utilizando as constantes de desativação térmica (k_d) que foram ajustadas aos modelos de desativação que apresentaram o melhor ajuste e as Equações 3.3 e 3.4, calcularam-se os tempos de meia-vida para cada temperatura. Os resultados estão apresentados na Tabela 4.2.

Tabela 4.2 - Valores de k_d e tempos de meia-vida calculados pelo modelo de primeira ordem de desativação térmica

T (°C)	k_d (min ⁻¹)	α	R ²	$t_{1/2}$ (min)
30	0,000529	0,400	0,92	3387,0
35	0,002498	--	0,93	277,5
40	0,019363	0,100	0,96	41,9
50	0,353965	0,051	0,99	2,1

A enzima incubada a 30 °C apresentou o maior tempo de meia vida (3387 min), a 40 °C observa-se uma redução considerável da atividade enzimática, pois o tempo de meia-vida foi de apenas 41,9 min, em sequência para 50 °C observa-se uma queda extremamente rápida da atividade com a temperatura, sendo o tempo de meia-vida de apenas de 2,1 minutos. Com os resultados apresentados na Tabela 4.2 e na Figura 4.6 é possível afirmar que a enzima β -galactosidase produzida a partir da *K. marxianus* é mais estável a temperaturas mais amenas (30; 35 °C) e pouco estável a altas temperaturas.

Para determinar a energia de ativação do processo de desativação térmica os resultados das constantes de desativação térmica (k_d) em função da temperatura foram ajustados ao modelo de Arrhenius (Equação 3.5) utilizando o software Origin[®] 7.0, obtendo a Equação 4.5 e a Figura 4.11.

Figura 4.11 - Ajuste ao modelo de Arrhenius (—) aos dados experimentais (valores de k_d)

$$\ln(k_d) = -32275,23 \cdot \frac{1}{T} + 98,91 \quad (4.5)$$

O ajuste linear ao modelo de Arrhenius (Equação 4.5) apresentou um coeficiente de determinação de 0,99 e a E_a calculada foi de 64,13 kcal.mol⁻¹.

Alves (2008) avaliou a estabilidade térmica da enzima β -galactosidase de *K. marxianus* livre e imobilizada, para 30 °C obteve-se um tempo de meia vida de 2310,6 min e a E_a calculada de 100 kcal mol⁻¹, comparando com os resultados obtidos neste trabalho observa-se que o tempo de meia vida obtido foi mais alto (3387,0 min) e o valor da energia de ativação da desativação térmica (E_a) foi menor de 64,13 kcal.mol⁻¹, dessa forma pode-se concluir que a enzima obtida neste trabalho é mais estável a um aumento de temperatura, ou seja, apresenta menor sensibilidade as variações de temperatura.

Heidtmann et al. (2012) estudaram o fracionamento da β -galactosidase de *K. marxianus* com sulfato de amônio e caracterizaram em relação a estabilidade térmica, avaliaram as temperaturas 30, 37, 40 e 45 °C. Para 30 °C obtiveram um tempo de meia-vida de 3468,0 minutos esse valor é aproximado ao obtido neste trabalho que foi de 3387,0 minutos, a aproximação foi boa, apresentando uma diferença de apenas 4% entre os tempos de meia-vida, a diferença pode estar associada à etapa de fracionamento da enzima com sulfato de amônia, erros experimentais ou mesmo erros associados aos cálculos.

4.3.2 Estudo da estabilidade da β -galactosidase solúvel ao pH

O pH do meio é muito importante e exerce uma influência significativa na estabilidade catalítica das enzimas em geral. A estabilidade da enzima ao pH é um fator que deve ser conhecido, tanto para um bom armazenamento, como para aplicação nos processos industriais. A Figura 4.12 ilustra a atividade residual (%) em relação à faixa de pH estudada (6,0; 6,5; 7,0; 7,3; 7,5 e 8,0) no tempo de incubação de 12 horas e temperatura de 30 °C.

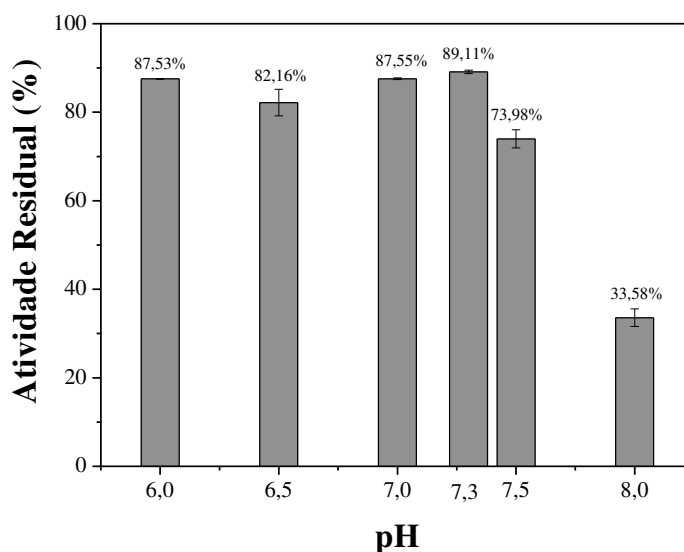


Figura 4.12 - Influência do pH na estabilidade da β -galactosidase solúvel em 30 °C e em tampão fosfato de sódio em pH 6,0; 6,5; 7,0; 7,3; 7,5 e 8,0.

Pela Figura 4.12 é possível observar que a enzima β -galactosidase em sua forma solúvel se apresentou estável na faixa de pH entre 6,0 a 7,3, mantendo a sua atividade superior a 80%. A maior estabilidade foi obtida no pH 7,3, no qual a enzima manteve aproximadamente 90% da sua atividade inicial, mesmo após 12 horas de incubação. A partir do pH 7,5 pode-se observar um decréscimo significativo na estabilidade enzimática, sendo que no pH 8,0 a enzima apresentou uma redução de cerca de 70% da sua atividade inicial.

Desse modo, a estabilidade da enzima β -galactosidase produzida a partir da *K. marxianus* apresenta estabilidade ao pH na faixa da neutralidade entre 6,0 a 7,3. Essa faixa de pH encontrada era esperada conforme a literatura, segundo Gékas; Lopez-Leiva, (1985) as enzimas provenientes de *K. marxianus* possuem boa faixa de trabalho em pH próximo à neutralidade.

Os resultados obtidos para estabilidade ao pH corroboram com os trabalhos da literatura, que apresentaram a estabilidade ao pH na faixa de 6,0 a 7,3, ou seja, na região de neutralidade. Assim, a seguir são descritos estudos de diferentes autores com intuito de encontrar a estabilidade da β -galactosidase ao pH, que foram similares à obtida neste trabalho.

Szczodrak (2000) avaliou a estabilidade ao pH da β -galactosidase livre e imobilizada de *K. fragilis*, na faixa de pH de 5,5 a 8,0 incubada em 30 °C por 12 horas. A estabilidade ao pH alcançada foi obtida na faixa da neutralidade, retendo mais de 90% da atividade inicial em pH 6,5 a 7,0. No pH 7,5 a enzima mostrou uma redução da estabilidade retendo apenas 40% da atividade. E a maior redução da estabilidade foi no pH 5,5 e no pH 8,0.

Medeiros (2008) avaliou a estabilidade ao pH de β -galactosidase de *K. marxianus* na faixa de pH entre 4,6 a 8,6, entretanto avaliou em diferentes temperaturas (4, 10, 25 e 37 °C). Para a temperatura de 25 °C os melhores resultados foram na faixa de pH entre 6 a 7, na qual a estabilidade foi superior a 80% em relação à inicial, após 10 horas de incubação.

Manera (2010) estudou a estabilidade ao pH da enzima β -galactosidase de *K. marxianus* CCT7082, na forma livre e obtidas da permeabilização das células de leveduras. As enzimas foram incubadas em tampão fosfato de potássio 0,1 M na faixa de pH de 5,0 a 9,0. E o pH 7,0 foi o mais estável tanto para as obtidas de células permeabilizadas como para as livres. Foi possível notar uma redução significativa da estabilidade a valores abaixo de 6,5 e acima de 7,0.

Scholz (2011) produziu β -galactosidase de *K. marxianus* e avaliou a estabilidade ao pH, a enzima foi incubada em 30 °C por 24 horas em pH 3, 4, 5, 6, 7 e 8. Na faixa de pH ácido de 3 a 5 a enzima apresentou baixa atividade, que pode ser explicada pela desnaturação da proteína. A faixa de maior estabilidade foi entre 6 e 7.

Segundo Ismail et al., (1997) as baixas atividades enzimáticas em pH mais ácido podem ser justificadas pela instabilidade conformacional da proteína. Já em valores mais altos de pH, de acordo com Ladero et al. (2000) a densidade dos grupos aminos ativos da enzima é muito maior do que a pH neutros, desse modo a enzima pode interagir mais nos meios básicos, perdendo assim atividade devido a uma mudança estrutural.

A β -galactosidase obtida por *K. marxianus* pode ser considerada uma enzima eficiente para processos que necessitam de uma faixa de trabalho próximo à neutralidade, como na indústria de laticínios, na qual os processos são realizados próximos ao pH do leite que é de 6,4 a 6,9 e também do soro doce que apresenta pH de aproximadamente 6,4 (BRASIL, 2002). A hidrólise da lactose tanto do leite como do soro de leite doce podem ser realizada na faixa de pH obtida da enzima β -galactosidase produzida neste trabalho a partir da *K. marxianus*, essa possibilidade contribui na elaboração de produtos lácteos isentos de lactose e também no reaproveitamento da lactose presente no soro de leite que é considerado um subprodutos altamente poluente.

4.2.3 Estabilidade ao armazenamento da β -galactosidase solúvel

A enzima β -galactosidase obtida pela *K. marxianus* foi armazenada durante sete semanas na forma não liofilizada à 10 °C e liofilizada à -15 °C, conforme descrito no item

3.3.3. A Figura 4.13 ilustra a manutenção da estabilidade frente ao armazenamento, relacionando a atividade residual e o tempo de armazenagem.

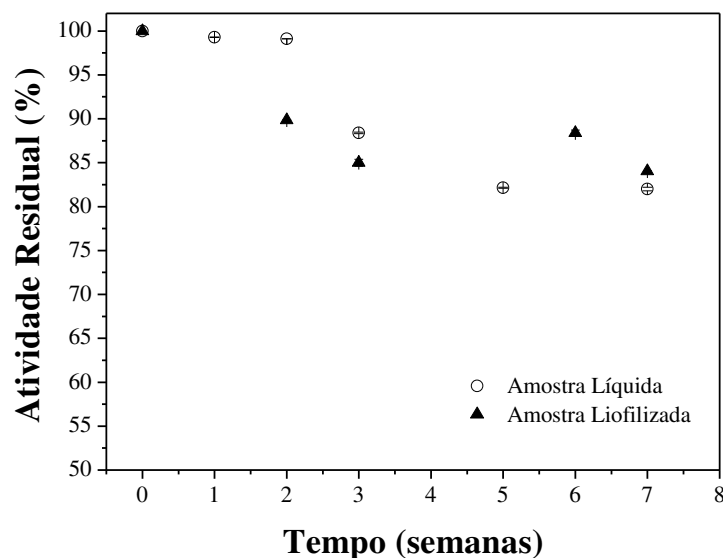


Figura 4.13 - Estabilidade ao armazenamento da β -galactosidase solúvel não liofilizada armazenada à 10 °C e liofilizada mantida à -15 °C

De acordo com a Figura 4.13 é possível observar que durante as sete semanas tanto a enzima solúvel não liofilizada e a enzima solúvel liofilizada mantiveram atividade residual superior a 80%. Os dois tipos de armazenamento para a enzima solúvel foram viáveis e se mostraram adequados. Assim, a escolha entre liofilizada ou não liofilizada deve ser realizada de forma a melhor atender as condições do processo no qual a β -galactosidase será aplicada.

Jochems et al. (2011) avaliaram a estabilidade da β -galactosidase solúvel e imobilizada de *K. lactis* a 5 °C em tampão tris-HCL. Em um período de sete dias a enzima solúvel manteve 46% da atividade inicial e depois de 14 dias a enzima já havia apresentado perda de 80% da sua atividade inicial. Comparando estes resultados com os obtidos neste trabalho da β -galactosidase de *K. marxianus* é possível observar que a enzima não liofilizada e liofilizada reterem cerca de 80% da atividade inicial em um período de aproximadamente de 50 dias, os valores obtidos foram maiores que os obtidos na imobilização da *K. lactis*, mesmo em um tempo maior de 50 dias.

Ansari e Husain (2011) avaliaram a imobilização de β -galactosidase de *A. orizae* em um suporte constituído de concavalina A-Celite 545, realizaram a estocagem da enzima livre e imobilizada durante 60 dias e observaram que a enzima imobilizada reteve 78% da atividade

enquanto a livre reteve apenas 40%, comparado com os resultados obtidos neste trabalho para β -galactosidase produzida de *K. marxianus*, tanto a enzima livre não liofilizada como a liofilizada apresentaram-se mais estáveis perdendo aproximadamente 20% da atividade inicial em aproximadamente 50 dias, enquanto a de *A. orizae* imobilizada em concavalina A-Celite 545 em 60 dias perdeu 78% da atividade.

Em relação ao armazenamento vale destacar a importância da liofilização da β -galactosidase, pois este processo é considerado uma das técnicas promissoras, que vem sendo muito utilizada para melhorar a estabilidade em longo prazo de proteínas e drogas lábeis. Nesse processo há uma inibição das degradações químicas e físicas, fornecendo também fácil manuseio, transporte e armazenamento dos produtos (KASPER; FRIESS, 2011).

Giovanini (2014) obteve bons resultados no armazenamento de uma peptidase purificada e posteriormente liofilizada de fungo *Scopulariopsis knoingii*. As amostras foram acompanhadas durante 32 dias sem adjuvantes e algumas com adjuvantes como maltodextrinas, após os 32 dias as amostras sem adjuvantes mantiveram cerca de 70% da atividade inicial, já as amostras com maltodextrina apresentou 100% da atividade inicial.

Além das vantagens mencionadas em relação à liofilização de enzimas uma possibilidade importante que deve ser considerada é a utilização da liofilização como técnica para concentração das enzimas, conforme foi realizado nesse trabalho.

4.3 IMOBILIZAÇÃO DA β -GALACTOSIDASE

A resina Duolite A-568 foi avaliada antes e após a imobilização da enzima β -galactosidase no MEV. Na Figura 4.14 é possível visualizar o MEV antes da imobilização a a) 30 x e a b) 300x.

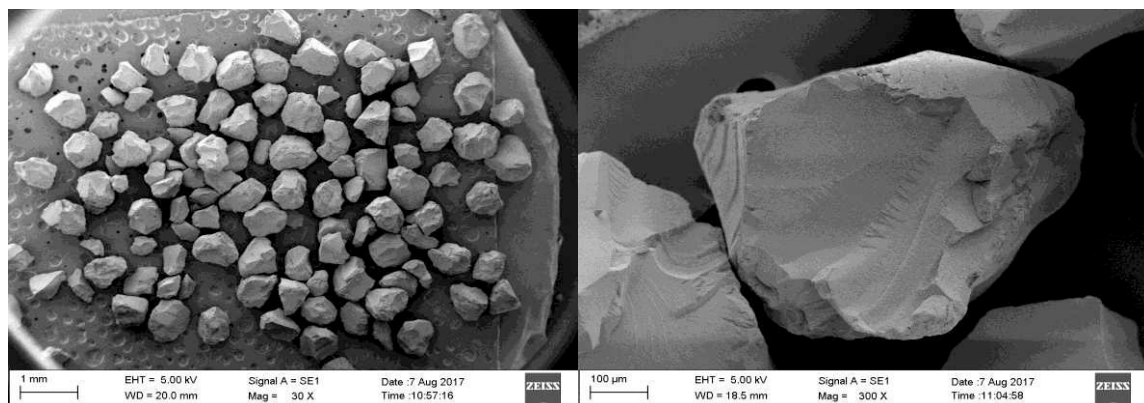


Figura 4.14 - Resina Duolite[®] A-568 ativada com solução de ácido clorídrico 1 M e hidróxido de sódio 1 M antes da imobilização da β -galactosidase a A) 30 X e B) 300 X

4.4 TESTES PRELIMINARES DE IMOBILIZAÇÃO DA β -GALACTOSIDASE

4.4.1 Avaliação da estabilidade da β -galactosidase solúvel nas condições de imobilização

Foi realizado o acompanhamento da enzima solúvel nas condições de imobilização utilizadas, para verificar qual a influência das condições do processo em relação à desativação da enzima devido à temperatura, rotação e tempo. Na Figura 4.15 é possível observar a atividade residual em relação ao tempo do processo.

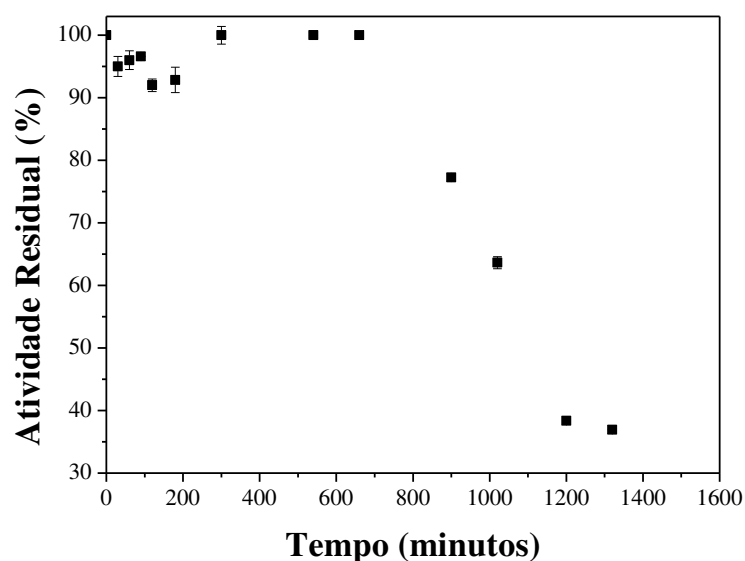


Figura 4.15 - Estabilidade da β -galactosidase solúvel pH 7,3 nas condições de imobilização de 150 rpm e 25 °C

Pela Figura 4.15 pode-se observar que a enzima manteve cerca de 100% da atividade inicial nos primeiros 700 minutos. Em seguida, a enzima passou por reduções significativas em sua atividade com o decorrer do tempo. Em 1300 minutos a redução da atividade foi de aproximadamente 80%. A diminuição da atividade (após os 700 minutos) pode ser justificada pela rotação (150 rpm) durante um longo tempo e pela possibilidade de contaminação do extrato bruto enzimático, que não foi purificado.

A temperatura pode ser comparada com os resultados obtidos no item 4.3.1, no qual definiu que a 30 °C a β -galactosidase solúvel na ausência de rotação manteve 80% da sua atividade inicial em 24 horas de incubação, sendo assim na temperatura de 25 °C não era esperado uma redução de atividade enzimática de 70%, como ocorreu e pode ser observado na Figura 4.15. Comparando também estes resultados com a estabilidade da enzima β -galactosidase solúvel armazenada sob refrigeração, obtida no item 4.3.3 é possível afirmar que a condição de rotação a 150 rpm, pode ter afetado a atividade, considerando que a enzima armazenada sob refrigeração e sem agitação manteve 80% da sua atividade inicial após sete semanas e na avaliação das condições de imobilização a enzima incubada em 150 rpm perdeu cerca de 70% da sua atividade inicial.

4.4.2 Avaliação do tempo de imobilização da β -galactosidase

Inicialmente a avaliação do tempo de imobilização foi realizada nos períodos de 1, 3 e 15 horas como é mostrado na Figura 4.16. A atividade recuperada foi calculada em relação ao tempo de imobilização.

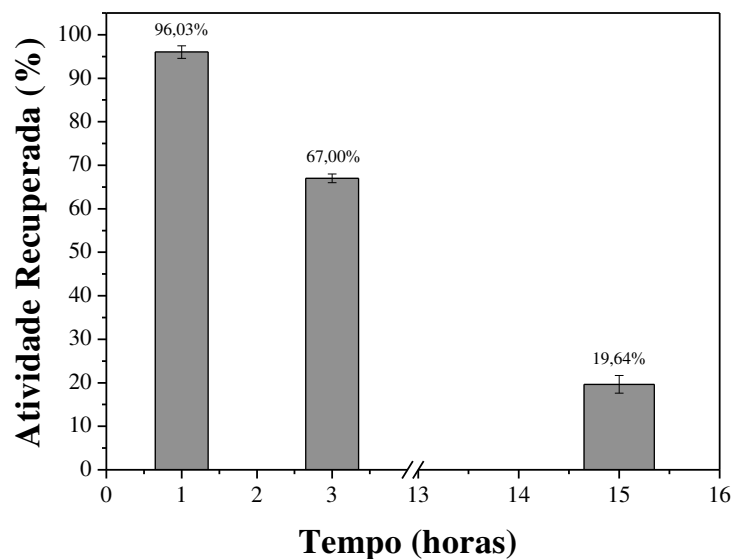


Figura 4.16 - Avaliação do tempo de imobilização ofertando 10 mL de extrato enzimático em 0,5 g de resina a 150 rpm e 25 °C

Como observado na Figura 4.16, para um maior tempo, 15 horas, obteve-se uma menor atividade recuperada, apenas 19%. Contudo, para imobilizações em menores períodos como 1 e 3 horas a atividade recuperada alcançou aproximadamente 96% e 67%, respectivamente. Com intuito de definir melhor o tempo de imobilização foi feita uma nova avaliação entre 0 e 3 horas.

A Figura 4.17 traz a avaliação do tempo na faixa de zero a três horas em relação à atividade recuperada calculada a partir da imobilização.

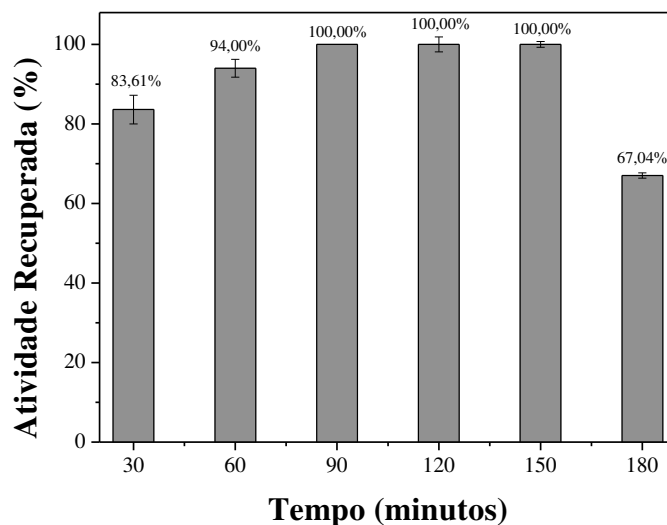


Figura 4.17 - Avaliação do tempo de imobilização de 0 a 180 minutos ofertando 10 mL de extrato enzimático em 0,5 g de resina a 150 rpm e 25 °C

Observando a Figura 4.17, nota-se que a atividade recuperada foi alta nos tempos de imobilização de 60 a 150 minutos, em 30 minutos a enzima apresentou cerca de 83% da atividade, nos tempos de 90, 120 e 150 minutos a atividade foi máxima (100%) e no tempo de 180 minutos a enzima passou por uma redução, perdendo aproximadamente 30% da sua atividade. Assim sendo, o tempo determinado para o processo de imobilização foi de 90 minutos, visto que foi o tempo necessário para alcançar a atividade recuperada máxima.

Guidini (2009) estudou a imobilização de β -galactosidase de *A. oryzae* em resina de troca iônica Duolite[®] A-568, em testes preliminares avaliou o tempo de imobilização e concluiu que as melhores atividades enzimáticas obtidas foram em tempos de imobilização maiores que duas horas, comparando estes resultados com os obtidos nesse trabalho da avaliação do tempo de imobilização da β -galactosidase de *K. marxianus* é possível concluir que a enzima obtida necessitou de um tempo menor de imobilização, sendo de apenas 90 minutos.

Tempos menores e eficientes são vantajosos para o setor industrial, possibilitando a expansão do processo e até mesmo reduzir custos, devido ao menor tempo de utilização de equipamentos.

4.4.3 Avaliação do volume de extrato enzimático na imobilização da β -galactosidase

Para determinar o melhor volume de imobilização foram conduzidos experimentos variando a oferta de extrato enzimático, como podem ser observados os resultados da atividade recuperada das imobilizações utilizando diferentes volumes na Figura 4.18.

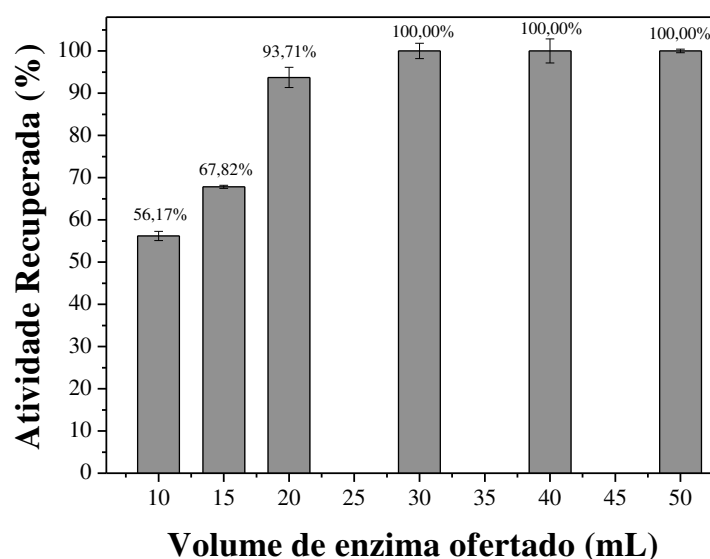


Figura 4.18 – Influência do volume ofertado na imobilização da β -galactosidase em 0,5 g de resina em 150 rpm e 25 °C

Como pode ser observado pela Figura 4.18, de acordo com o acréscimo no volume ofertado há um aumento na atividade recuperada, isso aconteceu até a oferta de 30 mL, a partir deste valor a atividade recuperada é estável e máxima, o que pode ser explicado pela saturação da resina de imobilização.

A atividade enzimática é variável nos extratos enzimáticos obtidos, dessa forma é difícil manter um padrão considerando apenas o volume, pois pode haver diferenças significativas. Assim, as condições de 30 mL a 50 mL foram padronizadas em relação à atividade ofertada e reproduzidas, os resultados obtidos são apresentados no item a 4.4.4.

4.4.4 Avaliação da atividade ofertada de enzima na imobilização da β -galactosidase

A partir dos testes de variação de volume apresentados no item anterior foi possível padronizar as concentrações de enzimas que foram definidas de acordo com a Tabela 4.3.

Tabela 4.3 - Padronização da atividade ofertada de enzima em relação ao volume ofertado na imobilização

Volume de enzima (mL)	Atividade Ofertada (U)
30	27
40	37
50	46

Definidas as atividades ofertadas, utilizou-se a atividade enzimática do extrato enzimático inicial para ponderar a oferta, desta maneira é possível que os volumes ofertados sejam maiores ou menores do que os volumes utilizados para definir as atividades ofertadas. É apresentada na Figura 4.19 a variação da atividade ofertada em função da atividade recuperada durante o processo de imobilização da β -galactosidase.

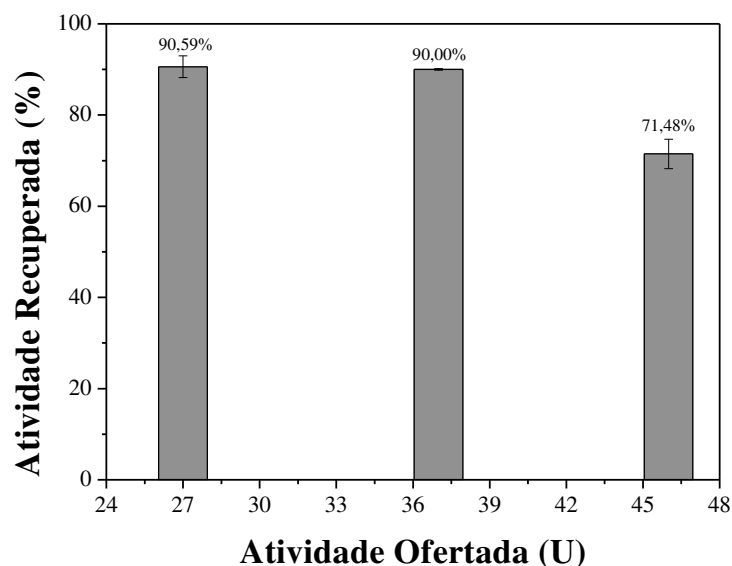


Figura 4.19 - Influência da atividade enzimática ofertada na imobilização da β -galactosidase em 0,5 g de resina em 150 rpm e 25°C

Como pode ser observado na Figura 4.19 obtida com a padronização da atividade ofertada na imobilização, houve uma redução na atividade recuperada. As atividades recuperadas nas ofertas iniciais de atividade de 27 e 37 U apresentaram uma atividade recuperada de 90%. Na atividade ofertada de 46 U a atividade recuperada foi cerca de 70%. A amostra com atividade ofertada de 46 U apresentou uma redução de aproximadamente 20% na atividade recuperada quando comparada aos resultados das amostras com atividades de 27 e 37 U.

Na Tabela 4.4 são apresentados os valores obtidos de atividade enzimática, volume de oferta e atividade recuperada do experimento apresentado na Figura 4.19.

Tabela 4.4 - Resultados obtidos das diferentes atividades enzimáticas ofertadas na imobilização da β -galactosidase em 0,5 g de resina

Amostra	Volume Inicial (mL)*	Atividade ofertada (U)	Volume correspondente a atividade ofertada (mL)**	Atividade enzimática (U)	Atividade Recuperada
Solúvel	--	--	--	5,73 \pm 0,10	--
Imobilizada	30	27	24	5,46 \pm 0,25	90,59 \pm 0,30
Imobilizada	40	37	32	5,16 \pm 0,01	90,00 \pm 0,16
Imobilizada	50	46	40	4,10 \pm 0,40	71,48 \pm 0,05

*Volume utilizado no item 4.4.3 para definir as atividades ofertadas de enzima (U).

**O volume correspondente à atividade ofertada calculado a partir da atividade enzimática inicial da enzima na forma solúvel.

Pela Tabela 4.4 é possível observar que a atividade enzimática e a atividade recuperada das amostras com atividade ofertada de 27 e 37 U apresentaram diferença extremamente pequena de 0,3 U e 0,59%, respectivamente. No entanto, a amostra com concentração de 46 U exibiu uma redução mais aparente cerca de 1 U para atividade enzimática e aproximadamente 20% da atividade recuperada. Essa redução em uma atividade ofertada maior pode indicar uma saturação do suporte de imobilização, ou seja, ele não consegue reter mais enzima.

Também é importante destacar na Tabela 4.4, a diferença de volume utilizado em cada atividade ofertada, como havia sido mencionado no item 4.3.2 os volumes ofertados inicialmente eram variáveis em cada atividade ofertada, sendo assim estes foram padronizados em atividade ofertada e foi possível observar que o volume ofertado na imobilização correspondente às atividades ofertadas definidas foram menores do que os utilizados no item 4.3.2. Para 27 U utilizou-se um volume de 24 mL, 6 mL a menos do volume no qual a atividade ofertada foi definida, em 37 U foram necessários 32 mL, 8 mL a menos do volume em que foi baseada a atividade ofertada e por fim a 46 U utilizou um volume com 10 mL a menos do valor inicial para padronização da atividade ofertada. Vale ressaltar que em determinados casos o volume a ser ofertado poderia ter sido maior, caso a atividade inicial da enzima solúvel a ser utilizada na imobilização fosse muito baixa, por exemplo, se a atividade inicial da enzima solúvel era de 3 U, para imobilizar com uma atividade de 27 U seria necessário ofertar 45 mL do extrato enzimático.

Diante do exposto, fica claro que tanto para a atividade ofertada de 27 U como para 37 U as atividades recuperadas foram altas (90%) podendo ser consideradas iguais, contudo optou-se pela atividade ofertada de enzima em 27 U para padronizar as condições de imobilização, pois nessa condição utilizou-se menos enzima para alcançar o mesmo resultado da atividade ofertada de 37 U, isso se torna bastante relevante considerando o alto custo de utilização das enzimas nos processos industriais e toda economia possível contribui para valorização do processo. Fazendo uma comparação em relação à quantidade de extrato enzimático utilizado na Tabela 4.4, para 27 U e 37 U utilizou-se 24 e 32 mL, respectivamente, nesse caso optando pela oferta de 27 U haveria economia de 8 mL de extrato enzimático, ou seja, 25% valor considerável.

4.4.5 Avaliação da imobilização com a enzima β -galactosidase liofilizada

O extrato enzimático usado na imobilização foi liofilizado por 24 horas, se apresentando como um pó fino e esbranquiçado, como pode ser observado na Figura 4.20.



Figura 4.20 - Extrato enzimático liofilizado

O extrato enzimático foi ressuspenso em metade do volume liofilizado em tampão fosfato de sódio 0,2 M em pH 7,3, em seguida foi ofertado em diferentes volumes para imobilização em resina Duolite[®] A-568. A Figura 4.21 ilustra as imobilizações utilizando a enzima liofilizada em diferentes volumes.

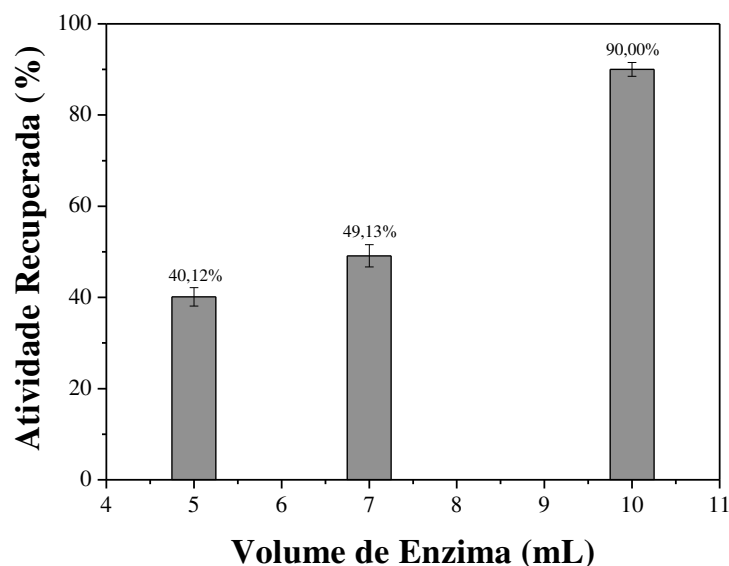


Figura 4.21 - Influência do volume ofertado de enzima liofilizada na imobilização da β -galactosidase em 0,5 g de resina a 150 rpm e 25 °C

Pela Figura 4.21 pode-se visualizar que a atividade recuperada nos diferentes volumes ofertados foi crescente alcançando o valor máximo de 90% em 10 mL. Como foi verificado no item 4.3.2 a atividade ofertada pode ser diferente em cada volume, nesse caso para 5, 7 e 10 mL a atividade ofertada foram de 10, 12 e 11 U, respectivamente. Interessante observar que o volume de 7 mL apresentou maior atividade ofertada que o volume de 10 mL. Mesmo com a maior atividade ofertada o volume de 7 mL apresentou a atividade recuperada de aproximadamente 50%, cerca de 40% menor que para o volume de 10 mL. Assim, mais uma vez fica clara a grande variação das atividades ofertadas em cada extrato enzimático obtido em diferentes fermentações. É necessário realizar a padronização da atividade ofertada na imobilização como foi feito nos testes anteriores para o extrato bruto (sem liofilização).

Com o objetivo de avaliar a influência do processo de liofilização na obtenção do biocatalisador imobilizado reproduziu-se a condição definida no item 4.3.4 ofertando uma atividade inicial de 27 U obtida a partir do extrato liofilizado. Na Tabela 4.5 verifica-se uma comparação entre a atividade recuperada obtida com a utilização do extrato bruto com e sem liofilização.

Tabela 4.5 - Comparação entre a imobilização da enzima não liofilizada e liofilizada com atividade ofertada de enzima 27 U nas condições de 0,5 g de resina, 150 rpm e 25 °C

Amostra	Atividade enzimática (U)	Atividade Recuperada (%)
Inicial Solúvel	7,21	--
Imobilizada com enzima não liofilizada	6,67 ± 0,25	90,59 ± 0,30
Imobilizada com enzima liofilizada	6,79 ± 0,05	93,69 ± 0,70

De acordo com a Tabela 4.5 pode-se observar uma diferença muito pequena entre as atividades recuperadas (3,1%) e atividades enzimáticas (0,12 U) do biocatalisador obtido utilizando a enzima não liofilizada e liofilizada na mesma atividade ofertada de 27 U. Como a variação entre as amostras é muito pequena, não chega a 5%, pode-se dizer que qualquer uma das condições utilizadas mostra-se viável para imobilização da β -galactosidase.

Neste trabalho, optou-se por utilizar a enzima liofilizada nos testes em que era necessário modificação do pH e concentração do tampão, pela necessidade de ruptura da célula em água deionizada, e posterior ressuspensão do extrato liofilizado no tampão desejado. Nos demais experimentos foram utilizados extratos brutos da enzima sem liofilização, alcançando redução de tempo de processo, assim como diminuição de custos operacionais.

Com a atividade ofertada na imobilização definida no item 4.3.5 como 27 U e a conclusão que é possível utilizar tanto as amostras não liofilizadas como as liofilizadas, optou-se por realizar uma reavaliação do tempo com a atividade ofertada de 27 U e a utilização da enzima liofilizada. Na Figura 4.22 está representada a reavaliação do tempo.

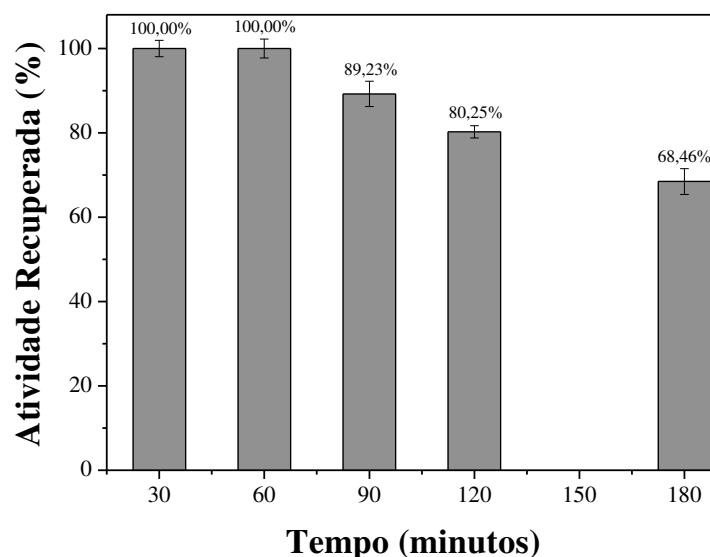


Figura 4.22 - Reavaliação do tempo de imobilização do extrato enzimático liofilizado em 0,5 g de resina, 150 rpm e 25 °C

Como é visualizada na Figura 4.22 a atividade recuperada foi máxima nos tempos iniciais de 30 e 60 minutos. A partir de 90 minutos houve uma redução da atividade recuperada até o fim do processo, sendo que o tempo de 180 minutos apresentou menor atividade recuperada, cerca de 70%. O tempo definido para as condições de imobilização foi em 60 minutos, suficiente para obtenção do biocatalisador imobilizado. Este tempo de imobilização (60 minutos) corrobora com o trabalho de Güdaz et al. (2012) que estudaram a imobilização de β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* em Resina Duolite[®] A-568 e definiram este mesmo tempo de imobilização.

4.5 OTIMIZAÇÃO DA IMOBILIZAÇÃO DA β -GALACTOSIDASE DE *Kluyveromyces marxianus*

Baseado nos resultados obtidos da caracterização da β -galactosidase solúvel, dos testes preliminares de imobilização e resultados da literatura, de acordo com Campello et al., (2012), foram estimadas as faixas do planejamento que apresentou como variáveis pH, concentração do tampão e atividade ofertada.

Os resultados apresentados na Tabela 4.6, para a atividade recuperada de imobilização, obtidos a partir do Planejamento Composto Central (PCC), foram analisados estatisticamente.

Tabela 4.6 - Matriz com os resultados obtidos da atividade recuperada do processo de imobilização da β -galactosidase de *K. marxianus*

Experimentos	pH	Concentração		Atividade Ofertada (U)	Atividade Recuperada (%)
		do Tampão (M)			
1	6,80 (-1)	0,40 (-1)		22,00 (-1)	69,03
2	6,80 (-1)	0,40 (-1)		32,00 (+1)	73,66
3	6,80 (-1)	1,20 (+1)		22,00 (-1)	43,24
4	6,80 (-1)	1,20 (+1)		32,00 (+1)	47,28
5	7,80 (+1)	0,40 (-1)		22,00 (-1)	46,22
6	7,80 (+1)	0,40 (-1)		32,00 (+1)	55,61
7	7,80 (+1)	1,20 (+1)		22,00 (-1)	35,22
8	7,80 (+1)	1,20 (+1)		32,00 (+1)	39,55
9	6,46 (- α)	0,80 (0)		27,00 (0)	51,28
10	8,14(+ α)	0,8 (0)		27,00 (0)	22,67
11	7,30 (0)	0,10 (- α)		27,00 (0)	49,04
12	7,30 (0)	1,50 (+ α)		27,00 (0)	37,49
13	7,30 (0)	0,80 (0)		18,59 (- α)	51,28
14	7,30 (0)	0,80 (0)		35,41 (+ α)	53,35
15	7,30 (0)	0,80 (0)		27,00 (0)	72,75
16	7,30 (0)	0,80 (0)		27,00 (0)	73,10
17	7,30 (0)	0,80 (0)		27,00 (0)	74,42

Observa-se na Tabela 4.6 que a atividade recuperada (AR) alcançada durante os experimentos variou de 22,67% a 74,42%. Os maiores valores encontrados foram nos experimentos 2, 16 e 17, sendo que os experimentos 16 e 17 correspondem ao ponto central e o experimento 2 corresponde ao pH, concentração do tampão no nível -1 e atividade ofertada no nível +1.

Realizou-se a análise da significância dos parâmetros do modelo a partir dos p-valores encontrados pelo teste t-Student, em que X_1 representa o pH, X_2 a concentração do tampão e X_3 a atividade ofertada na imobilização. O PCC foi considerado em nível de significância de 95%. Foram estimados os coeficientes de regressão das variáveis e interações (Tabela 4.6), bem como os valores dos níveis de significância relacionados a estes. São

representados na Tabela 4.7 todos os parâmetros lineares (L), as interações e os termos quadráticos (Q) das três variáveis estudadas.

Tabela 4.7 - Resultado da regressão múltipla aplicada ao PCC sobre o resultado da atividade recuperada da imobilização da β -galactosidase

Fatores	Coefficiente de Regressão	Erro Padrão	p-valor
Média	73,1200	0,508462	0,000048
X ₁ (L)	-7,6707	0,238570	0,000966
X ₁ (Q)	-11,1497	0,264261	0,000561
X ₂ (L)	-7,0403	0,234480	0,001107
X ₂ (Q)	-8,3404	0,246349	0,000871
X ₃ (L)	1,8937	0,238452	0,015488
X ₃ (Q)	-5,7050	0,263729	0,002130
X ₁ X ₂	3,1390	0,311569	0,009709
X ₁ X ₃	0,6300	0,311569	0,180550
X ₂ X ₃	-0,7059	0,311569	0,151692

Após a regressão múltipla, obteve-se a Equação 4.6 completa com todos os parâmetros:

$$AR = 73,12 - 7,67X_1 - 11,15X_1^2 - 7,04X_2 - 8,34X_2^2 + 1,89X_3 - 5,71X_3^2 + 3,14X_1X_2 + 0,63X_1X_3 - 0,71X_2X_3 \quad (4.6)$$

Da Tabela 4.7 verifica-se que as variáveis significativas do modelo foram: o pH , a concentração do tampão e a atividade ofertada nos seus termos lineares (X₁ (L), X₂ (L) e X₃ (L)) e quadráticos (X₁ (Q), X₂ (Q) e X₃ (Q)) e a interação pH e concentração do tampão (X₁X₂). Na Tabela 4.8 são apresentados os parâmetros significativos após a retirada dos termos não significativos.

Tabela 4.8 - Resultado da regressão múltipla aplicada ao PCC sobre o resultado da atividade recuperada da imobilização da β -galactosidase com parâmetros significativos

Fatores	Coefficientes de Regressão	Erro Padrão	p-valor
Média	73,1200	0,508462	0,000048
X ₁ (L)	-7,6707	0,238570	0,000966
X ₁ (Q)	-11,1497	0,264261	0,000561
X ₂ (L)	-7,0403	0,234480	0,001107
X ₂ (Q)	-8,3404	0,246349	0,000871
X ₃ (L)	1,8937	0,238452	0,015488
X ₃ (Q)	-5,7050	0,263729	0,002130
X ₁ X ₂	3,1390	0,311569	0,009709

Utilizando os resultados, para atividade recuperada (AR) da imobilização apresentados, na Tabela 4.8, após a regressão múltipla, obteve-se a Equação 4.7 com os parâmetros significativos.

$$AR = 73,12 - 7,67X_1 - 11,15X_1^2 - 7,04X_2 - 8,34X_2^2 + 1,89X_3 - 5,71X_3^2 + 3,14X_1X_2 \quad (4.7)$$

De acordo com a Equação 4.7 pode ser verificado, pelos coeficientes, que um aumento do pH (X₁) e da concentração do tampão (X₂) influencia negativamente a atividade recuperada, ou seja, quanto maiores esses valores menor será a atividade recuperada. Já a atividade ofertada (X₃) indica que um aumento na atividade ofertada implica positivamente na atividade recuperada. O pH é o que mais influencia na resposta da atividade recuperada seguido da concentração do tampão e por último a atividade ofertada na faixa estudada.

Pela análise de variância (ANOVA) é possível observar pela Tabela 4.9, que o F_{calc} foi significativo. O resultado de F calculado (F_{calc}) foi superior ao F tabelado (F_T) para um nível de significância de 5%. Esses resultados indicam uma boa concordância entre os valores experimentais e previstos pelo modelo, expressos na Figura 4.19.

Tabela 4.9 - ANOVA para resposta da atividade recuperada da imobilização de β -galactosidase

Fonte de variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F_{calc}	p-valor
Regressão	3397,353	7	485,336	8,477	0,00506
Resíduos	396,876	9	57,251		
Total	3794,229				

$$F_T = F_{7; 9; 0,05} = 3,676$$

O coeficiente de determinação (R^2) obtido após o ajuste dos dados experimentais ao modelo foi 0,90 o que indica uma boa concordância entre os valores experimentais e os previstos pelo modelo. O $R^2=0,90$ indica que 90% da variabilidade dos dados experimentais foram explicados pela equação empírica proposta.

A análise estatística dos resultados experimentais é apresentada nas Figuras de 4.23 a 4.25.

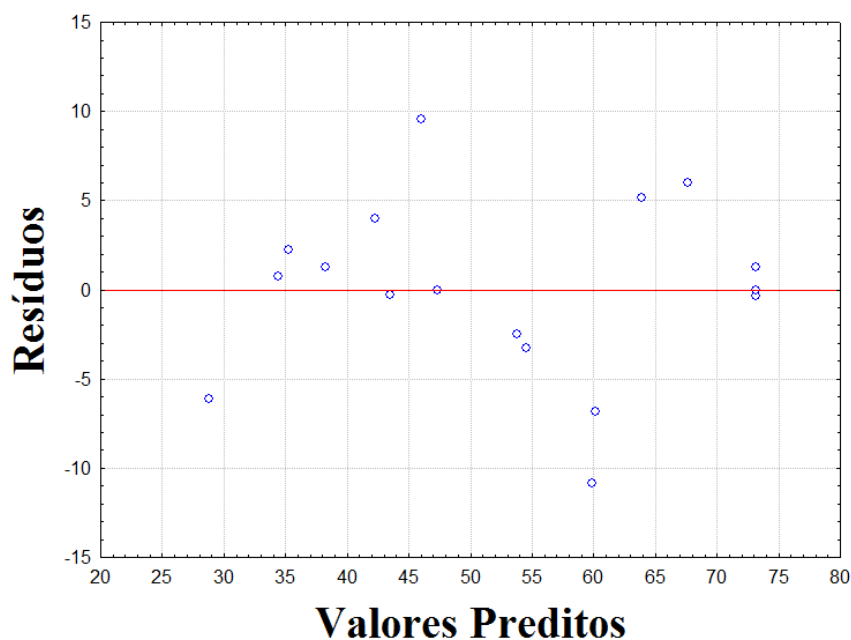


Figura 4.23 - Distribuição de resíduos relativos à imobilização de β -galactosidase

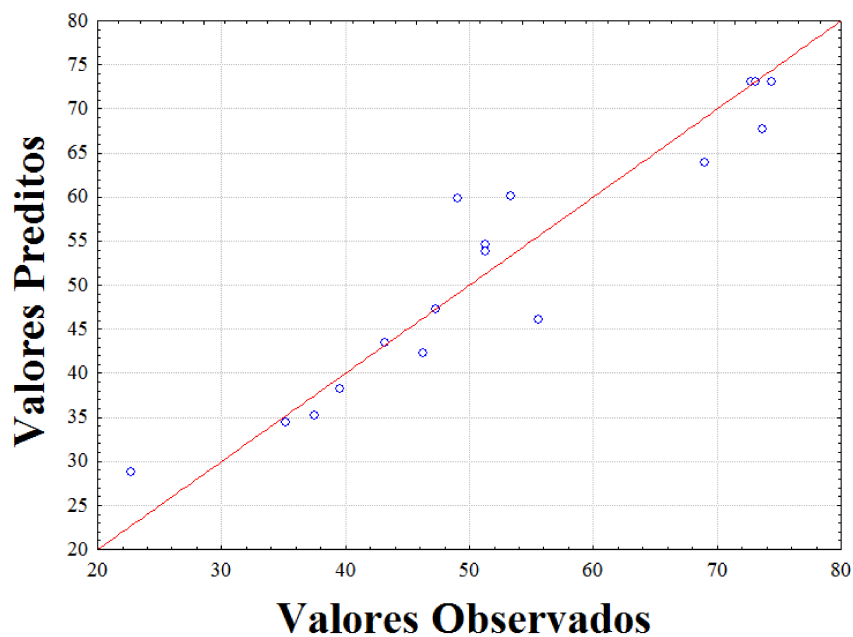


Figura 4.24 - Valores preditos em relação aos valores observados à imobilização de β -galactosidase

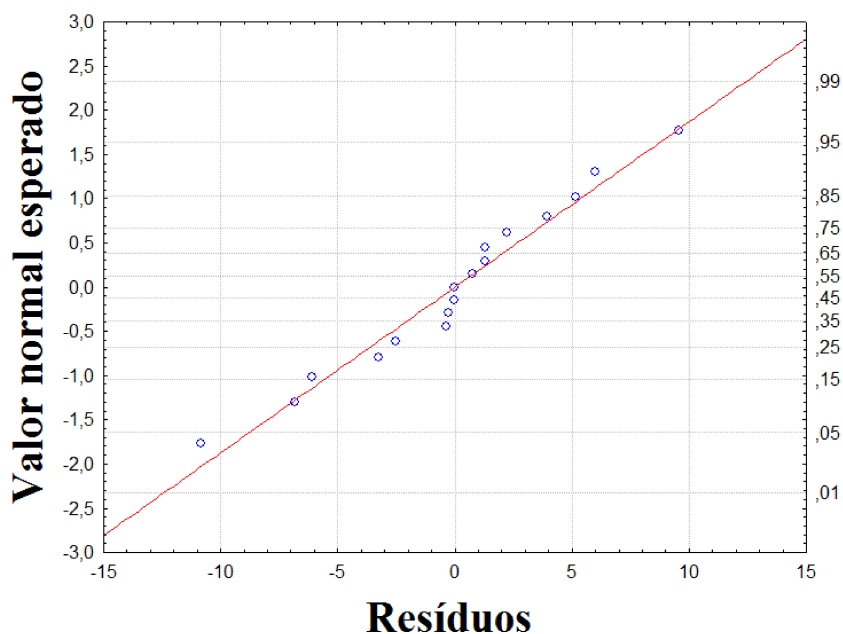


Figura 4.25 - Valores dos resíduos em relação ao valor normal esperado para imobilização de β -galactosidase

Pela Figura 4.23 pode ser visualizado que a distribuição dos resíduos se apresenta aleatoriamente em torno de zero, sem representar tendência em relação à distribuição. Na Figura 4.24 observa-se que as respostas obtidas dos experimentos de imobilização da enzima apresentaram valores próximos aos fornecidos pela Equação 4.7.

Os resíduos se mostraram aleatórios, independentes e identicamente distribuídos, com distribuição normal de média zero e variância constante conforme Figura 4.25.

A partir do modelo obtido foi possível construir as curvas de contorno, que mostram a influência do pH, concentração do tampão e atividade ofertada na atividade recuperada da imobilização da β -galactosidase de *K. marxianus*. As curvas de contorno são ilustradas na Figura 4.26.

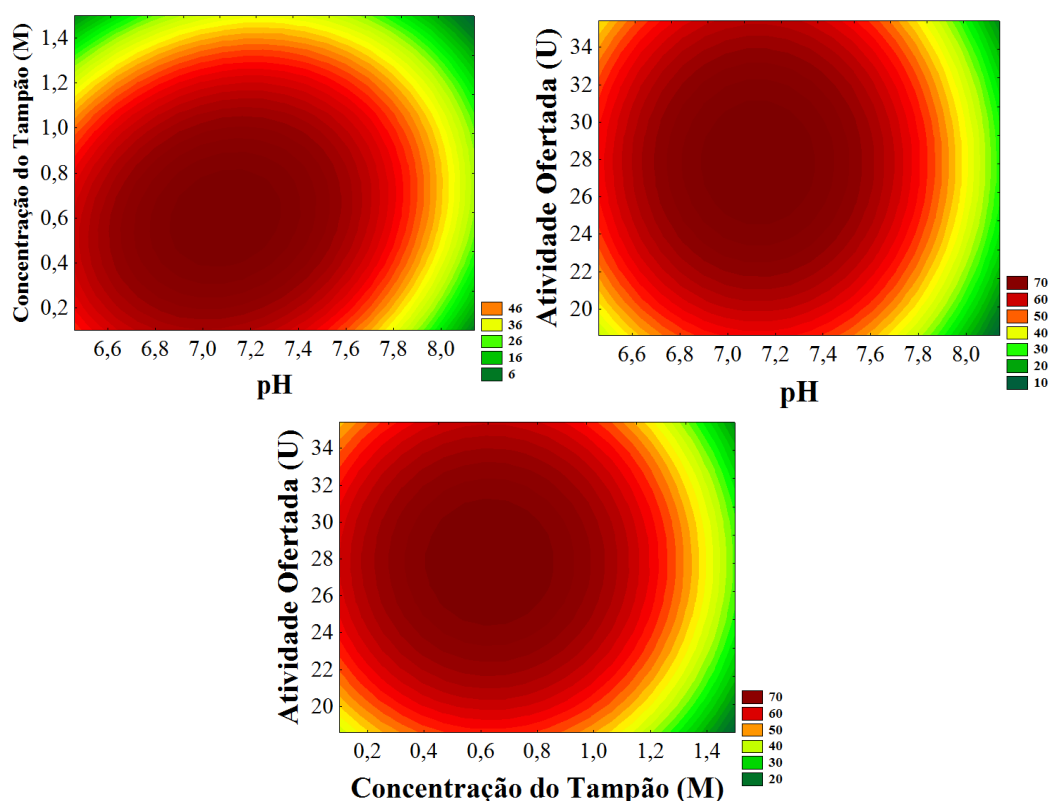


Figura 4.26 - Curvas de contorno da influência do pH, concentração do tampão e atividade ofertada na atividade recuperada da imobilização da β -galactosidase.

Na Figura 4.26 as curvas de contorno indicam as regiões ótimas, analisando a influência das variáveis estudadas na resposta atividade recuperada. Os melhores resultados foram obtidos para valores de pH entre 6,9 a 7,3, concentração do tampão entre 0,4 a 0,8 M e atividade ofertada entre 24 e 31 U.

Campello et al., (2012) avaliaram a imobilização de β -galactosidase de *K. lactis* em Eupergit[®] e obtiveram como resultados uma influência negativa do pH e influência positiva da força iônica do tampão e volume de enzima ofertado. Tanto o resultado para pH como volume de enzima são similares aos obtidos neste trabalho, entretanto o efeito da força iônica foi contrária, pois eles concluíram que o aumento na força iônica melhorava o rendimento da imobilização, este resultado pode ser explicado pelo suporte utilizado na imobilização que é

de natureza hidrofóbica e com o aumento da concentração de sais houve um favorecimento das forças hidrofóbicas, sendo favorecido em altas forças iônicas. Desse modo a diferença entre o estudo deles e o trabalho em questão foi devido a utilização de suportes distintos que eram respectivamente, Eupergit[®] e resina Duolite[®] A-568.

A concentração do tampão expressa em força iônica, promoveu um acréscimo na atividade recuperada até 0,8 M, contudo concentrações do tampão maiores que 0,8 M foram suficientes para afetar negativamente a atividade recuperada da imobilização da β -galactosidase. A adsorção é sensível a variações de força iônica, de acordo com Ferreira (2001) apud Leaver et al. (1996), quanto maior a força iônica do tampão (maior concentração), menor será a quantidade de substância adsorvida, pois existe competição entre as proteínas e os íons presentes na solução do tampão pelo sítio de adsorção da resina. Por outro lado, a alta força iônica também pode levar à desnaturação proteica da enzima. Desse modo, fica claro que tudo dependerá do processo de adsorção da proteína e também do tipo de suporte utilizado na imobilização. E é necessário que essa variável seja escolhida com cuidado para obter o equilíbrio correto entre ligação máxima da enzima e o suporte e que a desnaturação seja mínima (Campello et al., 2012).

Em relação ao pH, valores superiores a 7,3 interferiram negativamente na atividade recuperada do processo de imobilização, essa consequência pode estar relacionada à estabilidade da enzima, o que é coerente com os resultados obtidos no item 4.3.2 relativos à caracterização da enzima solúvel quanto ao pH, tendo como pH de maior estabilidade 7,3. Além disso, a elevação do pH também pode gerar a desnaturação da proteína.

A atividade ofertada afeta positivamente a atividade recuperada da imobilização de β -galactosidase, a faixa ótima foi de 24 a 31 U. Liu et al. (2012) avaliaram a imobilização de β -galactosidase de *K. fragilis* em epóxi nanométrico magnético para síntese de galactooligossacarídeos. Na imobilização variaram a concentração enzimática de 1 a 6 mg de proteína.mL⁻¹ dessa forma, concluíram que a atividade de recuperação da imobilização aumentou de 1 a 4 mg de proteína.mL⁻¹ e após esse valor houve uma redução. Os resultados podem ser comparados com os obtidos neste trabalho, nesse estudo em questão a concentração foi baseada na atividade ofertada (24 a 31 U) e da mesma forma houve um aumento até 31 U e depois desse valor uma redução da atividade recuperada, o mesmo aconteceu no trabalho mencionado, já que após 4 mg de proteína.mL⁻¹ o resultado também foi negativo. Esse fato pode ser justificado pela saturação ou inibição do suporte utilizado.

Foi realizado, em triplicata, um experimento de validação do modelo nas condições do ponto central que foi o melhor ensaio (pH 7,3, concentração do tampão 0,8 M e atividade ofertada 27 U). A Tabela 4.10 ilustra os resultados da validação.

Tabela 4.10 - Atividade recuperada obtida no experimento de validação do PCC

Ensaio	Atividade Recuperada (%)
1	71,06
2	69,01
3	73,52

De acordo com a Tabela 4.10 é possível observar que a atividade recuperada média obtida nos experimentos de validação foi de 71,19% valor próximo ao predito pelo modelo de 73,12%, o erro experimental foi de apenas 2,6% valor inferior ao nível de significância a 5%.

4.5 IMOBILIZAÇÃO COM A ENZIMA COMERCIAL

A avaliação da imobilização foi realizada com a enzima comercial Lactozyme[®] em tampão fosfato de sódio 0,8 M e pH 7,3, os resultados podem ser observados na Tabela 4.11.

Tabela 4.11 - Resultados referentes à imobilização da enzima comercial Lactozyme[®]

	Atividade Ofertada 27 U	Atividade Ofertada 54 U
Atividade Inicial (U)	27,00	54,00
Atividade da enzima imobilizada (U)	16,52	33,10
Atividade Recuperada (%)	61,19	61,30

Como pode ser observada na Tabela 4.11 mesmo a enzima comercial que é de alta pureza, apresentou redução na atividade da enzima imobilizada. A atividade recuperada média foi de 61% para as duas atividades ofertadas. De acordo com os resultados da atividade enzimática após a imobilização é possível notar uma redução de 10,48 e 20,90 U de atividade enzimática correspondente às atividades ofertadas de 27 e 54 U, respectivamente, comparando a atividade da enzima solúvel com a atividade da enzima imobilizada.

Foi realizada uma comparação entre os resultados obtidos da imobilização com o extrato enzimático bruto produzido pela fermentação da levedura *K. marxianus* e a enzima comercial Lactozyme[®], como pode ser verificado na Tabela 4.12.

Tabela 4.12 - Comparação entre a imobilização da enzima β -galactosidase produzida e a β -galactosidase comercial Lactozyme[®] com atividade ofertada inicial de 27 U; pH 7,3; 150 rpm e 25 °C na imobilização

	Imobilização da β-galactosidase comercial Lactozyme[®]	Imobilização com β-galactosidase produzida
Atividade Inicial (U)	27,00	5,73
Atividade da enzima imobilizada (U)	16,52	5,37
Atividade Recuperada (%)	61,19	90,59

Como pode ser observada na Tabela 4.12, comparando as atividades enzimáticas das enzimas imobilizadas com a enzima comercial e com a enzima produzida houve uma redução de 10,48 U e 0,36 U, respectivamente da atividade inicial para a atividade da enzima imobilizada. Desse modo, é possível concluir que a enzima produzida apresentou potencial para imobilização em resina Duolite[®] A-568 se sobressaindo aos resultados quando comparados à enzima comercial. A atividade recuperada da enzima produzida também foi superior a da comercial sendo de 90,59%, enquanto a comercial apresentou atividade recuperada de 61,19%, ou seja, a β -galactosidase produzida apresentou atividade recuperada 29,4% maior que a comercial.

4.6 IMOBILIZAÇÃO EM SÉRIE DA ENZIMA β -GALACTOSIDASE

Quando se obtém o extrato enzimático bruto é possível que além da enzima de interesse, β -galactosidase, uma série de outras proteínas e demais interferentes podem estar nessa solução, estes podem apresentar atividade catalítica indesejável em relação aos substratos ou mesmo os produtos. Para as reações biotecnológicas é interessante ter enzimas que apresentem alta eficiência, nesse caso é viável eliminar estes interferentes que podem estar presentes no processo (BARBOSA et al., 2015).

Técnicas de purificação devem ser introduzidas para melhorar a aplicação das enzimas nos processos, contudo essa adição pode gerar aumentos significativos de custos. Assim, é muito interessante tentar unir purificação e imobilização em uma única etapa (GARCIA-GALAN et al., 2011).

Com intuito de avaliar o processo de imobilização como estratégia para pré-purificação do extrato enzimático produzido foram realizados testes com duas imobilizações, sendo a primeira etapa caracterizada como uma pré-purificação e a imobilização propriamente dita na segunda etapa. Os resultados são apresentados na Tabela 4.13.

Tabela 4.13 - Resultados da pré-purificação da enzima β -galactosidase

Amostra	Atividade Enzimática (U)	Atividade Recuperada (%)
Inicial (solúvel)	11,23	
Primeira imobilização	2,56	22,80
Sobrenadante da primeira imobilização	7,68	--
Segunda imobilização*	5,04	65,63

*Utilizando sobrenadante residual da primeira imobilização

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 4.13 as duas imobilizações foram eficientes para aumentar a atividade enzimática. A atividade enzimática da enzima solúvel usada na imobilização foi de 11,23 U, após a primeira imobilização (pré-purificação) obteve-se uma atividade de apenas 2,56 U para a enzima imobilizada, atividade baixa comparada à inicial, apresentou uma redução de 8,67 U, ou seja, provavelmente muitos interferentes ocuparam o lugar da enzima no suporte impedindo o acesso da mesma. Logo, pode-se notar que já na segunda imobilização a redução de atividade enzimática foi menor, a atividade inicial dessa imobilização passa a ser a atividade do sobrenadante restante da primeira imobilização que foi utilizado na segunda imobilização.

A atividade enzimática inicial do sobrenadante foi de 7,68 U e a atividade enzimática da segunda imobilização foi de 5,03 U, assim a redução de atividade foi de apenas 2,65 U, comparando com a primeira imobilização (pré-purificação) pode-se dizer que na primeira teve uma redução de aproximadamente 71% enquanto na segunda apenas 34% de redução na atividade enzimática.

Esse aumento de atividade enzimática na segunda imobilização pode ser justificada pelo incremento de pureza do extrato enzimático, visto que parte das impurezas que

apresentaram afinidade com a resina podem ter sido retidas na primeira imobilização e na segunda imobilização mais enzimas (β -galactosidase) foram adsorvidas na resina aumentando assim a atividade enzimática.

Comparando as duas imobilizações com os testes anteriores de apenas uma imobilização, pode-se observar em determinado ensaio em uma única imobilização, a atividade inicial era de 11,82 U após a imobilização a atividade da enzima imobilizada foi de apenas 3,84 U, muito baixa. Ou seja, duas imobilizações poderiam ter dobrado o valor da enzima imobilizada pela segunda vez como foi indicado na Tabela 4.13 (2,56 U para 5,04 U).

4.7 TESTES PRELIMINARES DA RETICULAÇÃO COM GLUTARALDEÍDO

Para reticulação com glutaraldeído realizaram-se testes preliminares variando a concentração da solução. Após a reticulação avaliou-se também a estabilidade em 2 horas a 30 °C. Os resultados são apresentados na Tabela 4.14.

Tabela 4.14 - Avaliação da reticulação com glutaraldeído em diferentes concentrações

	Concentração de Glutaraldeído		
	0,14 (g.L ⁻¹)	0,35 (g.L ⁻¹)	3,50 (g.L ⁻¹)
Atividade Inicial (U)	14,56	11,58	17,27
Primeira Imobilização (U)	2,28	2,14	2,20
Segunda Imobilização (U)	6,22	5,70	5,51
Reticulação com glutaraldeído	3,89	2,07	0,36
Estabilidade em 30 °C a 2 horas	2,69	1,82	--

A Tabela 4.14 apresenta os resultados referentes às variações das concentrações da solução de glutaraldeído. É possível observar que o glutaraldeído afetou a atividade enzimática, sendo que quanto maior a concentração da solução de glutaraldeído maior foi a redução na atividade enzimática. Utilizando uma solução a 3,5 g.L⁻¹ a atividade enzimática foi 0,36 U apresentando uma redução de cerca de 93% em relação à atividade da segunda

imobilização, para 0,35 g.L⁻¹ a redução foi de 68% (5,70 U para 2,07 U) e para 0,14 g.L⁻¹ a redução foi de 37% (6,22 U para 3,89 U).

A estabilidade em 2 horas foi realizada nas duas menores concentrações e mesmo com a reticulação com glutaraldeído houve perda na atividade durante o tempo de incubação a 30 °C, na concentração de 0,35 g.L⁻¹ a redução foi de 12% (2,07 U para 1,82 U) enquanto para 0,14 g.L⁻¹ a redução foi de 31% (3,89 U para 2,69 U). As duas concentrações tiveram as suas atividades diminuídas com o glutaraldeído, contudo pode-se observar que na concentração de 0,35 g.L⁻¹ a perda de atividade foi menor em relação à concentração de 0,14 g.L⁻¹, pois a sua redução foi de apenas 12%, enquanto a outra teve 31% da sua atividade perdida, assim pode-se dizer que a concentração mais baixa de glutaraldeído não foi suficiente para manter a estabilidade durante as duas horas a 30 °C.

CAPÍTULO 5

CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos pode-se concluir que:

- ✓ A produção da β -galactosidase foi possível e satisfatória pela fermentação submersa da *Kluyveromyces marxianus*, utilizando como principal fonte de carbono o permeado de soro de leite.
- ✓ A partir da caracterização da enzima β -galactosidase solúvel observou-se que a estabilidade térmica da enzima é limitada, sendo mais estável a 30 °C. A estabilidade ao pH foi da faixa de 6,0 a 7,3, com a melhor estabilidade a pH 7,3. Em relação à estabilidade ao armazenamento, tanto a enzima solúvel não liofilizada como na forma liofilizada, alcançaram uma atividade de cerca de 80% mesmo após sete semanas de armazenamento.
- ✓ O método de imobilização da enzima β -galactosidase em resina Duolite[®] A-568 apresentou melhor atividade recuperada (90,59%) do biocatalisador em atividade ofertada de 27 U e tempo de imobilização de uma hora para 0,5 g de resina, resultados definidos a partir dos testes preliminares.
- ✓ Na comparação dos métodos de imobilização com a enzima não liofilizada e liofilizada foi possível concluir que pode-se optar por qualquer uma das enzimas, considerando que não houve diferença entre as duas formas na atividade recuperada do biocatalisador.
- ✓ Os melhores resultados obtidos do Planejamento Composto Central, que avaliou a influência do pH, concentração do tampão e atividade ofertada na atividade recuperada da enzima imobilizada foi nas faixas de pH 6,9 a 7,3, concentração do tampão de 0,4 a 0,8 M e atividade ofertada de 24 a 31 U.
- ✓ Pela reticulação com glutaraldeído foi possível concluir que o aumento da concentração causou diminuição na atividade da enzima imobilizada, na maior concentração de 3,5 g.L⁻¹ houve uma redução de cerca de 93% da atividade enzimática.
- ✓ Realizando testes com a enzima β -galactosidase produzida pela levedura *K. lactis*, Lactozyme[®] comercial, foi possível observar que houve perdas na

atividade enzimática com a imobilização na resina Duolite A-568 para as duas concentrações de 27 e 54 U.

- ✓ A imobilização em série realizada com duas imobilizações do extrato enzimático foi importante para aumentar a atividade enzimática da enzima imobilizada, o valor da primeira imobilização para a segunda foi praticamente duplicado.
- ✓ As condições estudadas mostram o potencial de aplicação da enzima β -galactosidase produzida pela *Kluyveromyces marxianus* e imobilizada pela resina Duolite[®] A-568, deve-se se dar uma atenção para as técnicas de purificação com intuito de aumentar a atividade enzimática e também observar com cuidado as condições de imobilização com o objetivo de sempre maximizar as condições.

CAPÍTULO 6

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- ✓ Caracterizar o biocatalisador imobilizado em termos de pH, temperatura, estabilidade, reuso e estocagem;
- ✓ Avaliar a hidrólise de lactose do permeado de soro de leite pela enzima β -galactosidase imobilizada em reator de leito fixo com reciclo.
- ✓ Avaliar a hidrólise da lactose em leite comercial pela enzima β -galactosidase produzida.
- ✓ Utilizar o sobrenadante restante das imobilizações e liofilizar para uma nova imobilização em resina Duolite[®] A-568.

CAPÍTULO 7

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBUQUERQUE, T. L.; PEIRCEA, P.; RUEDAD, N.; MARZOCHELLAC, A.; GONÇALVES, L. R. B.; ROCHAB, M. V. P.; FERNANDEZ-LAFUENTEA, R. Ion exchange of β -galactosidase: The effect of the immobilization pH on enzyme stability. **Process Biochemistry**, v. 51, p. 875–880, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2016.03.014>

ALEJANDRA, O.; RAMÍREZ, MATHEUS; NILO RIVAS, R. Producción y caracterización parcial de β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* propagada em suero de leche desproteinizado. **Archivos Latino americanos de Nutrición**, v. 53, n.2, p.194-201, 2003.

ALMEIDA, A. C. S., ARAÚJO L. C., COSTA A. M., ABREU C. A. M., LIMA M. A. G. A., PALHA M. L. A. P. F. Sucrose Hydrolysis Catalyzed by Auto-immobilized Invertase into Intact Cells of *Cladosporium Cladosporioides*. **Process Biotechnology**, v. 8, 2005. [Doi: 10.2225/vol8-issue1-fulltext-11](https://doi.org/10.2225/vol8-issue1-fulltext-11)

ALVES, F. G. **Produção de β -galactosidase *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 em fermentador e caracterização parcial da enzima livre e imobilizada.** 2008. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Rio Grande, Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciências de Alimentos, 112.

ALVES, M. P.; MOREIRA, R. O.; RODRIGUES JUNIOR, P. H.; MARTINS, M. C. F.; PERRONE, I. T.; CARVALHO, A. F. Soro de leite: Tecnologias para o processamento de coprodutos. **Rev. Inst. Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 69, n. 3, p. 212-226, 2014. <https://doi.org/10.14295/2238-6416.v69i3.341>

ANDRADE, R. S.; ALMEIDA NETO, J. A.; LOPES, R. C. S. Q. Valorização biotecnológica de soro de leite por fermentação utilizando *Saccharomyces cerevisiae*. **Estudos Tecnológicos em Engenharia**, vol. 11, n. 2, p. 82-91, 2015. [Doi: 10.4013/ete.2015.112.04](https://doi.org/10.4013/ete.2015.112.04)

ANSARI, A. S.; HUSAIN, Q. Immobilization of *Kluyveromyces lactis* β -galactosidase on concanavalin A layered aluminium oxide nanoparticles-Its future aspects in biosensor applications. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 70. p 119-126. 2011. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2011.02.016>

ANSARI, S. A.; SATAR, R. Recombinant β -galactosidases – Past, present and future: A mini review. **Journal of Molecular Catalysis B, Enzymatic**, v. 81, p. 1-6, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2012.04.012>

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. 179 f. 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. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2004.08.001>

BARBOSA, M. R.; ARAUJO, E. H.. **Estudo da produção da enzima lactase utilizando soro de queijo e fungo filamentosos *Aspergillus niger***. In: VI ENCONTRO INTERNO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, Uberlândia, 2007.

BARBOSA, O.; ORTIZ, C.; BERENQUER-MURCIA, A.; TORRES, R.; RODRIGUES, R. C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Strategies for the one-step immobilization-purification of enzymes as industrial biocatalysts. **Biotechnology Advances**, v.33, p. 435, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.03.006>

BLANCO, R.M.; CALVETE, J.J.; GUISÁN, J.M. Immobilization-stabilization of enzymes; variables that control the intensity of the trypsin (amine) –agarose (aldehyde) multipoint attachment. **Enzyme and Microbial Technology**, v.11, p.353-359.1989. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(89\)90019-7](https://doi.org/10.1016/0141-0229(89)90019-7)

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

BOSSIO, J.P.; HARRY, J.; KINNEY, C.A. Application of ultrasonic assisted extraction of chemically diverse organic compounds from soils and sediments. **Chemosphere**, v. 50, n. 9, p. 858-864, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.06.088>

BOZA, Y.; GOMES, R. A. R.; BLUMER, P. Lactose: alternativa para o uso do soro e para diversificação do setor de lácteos. **Revista Laticínios**, n. 104, p. 62-66, 2013.

BRAGA, A. R. C.; MANERA, A. P.; ORES, J. C.; SALA, L.; MAUGERI, F.; KALIL, S. J. Kinetics and Thermal Properties of Crude and Purified β -Galactosidase with Potential for the Production of Galactooligosaccharides. **Food Technology Biotechnology**, v. 51, p. 45–52, 2013.

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

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução RDC n° 53. Enzimas e Preparações Enzimáticas para Uso na Produção de Alimentos Destinados ao Consumo Humano. **Diário Oficial da União**, Brasília, 07 out. 2014.

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

BUNACIU, A.A.; ABoul-ENEIN, H. Y.; HOANG, V. D. Vibrational spectroscopy used in milk products analysis: A review. **Food Chemistry**, v. 196, p. 877–884, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.10.016>

CABRAL, B. V.; FALLEIROS, L. N. S. S.; RIBEIRO, E. L. Estudo da imobilização de invertase em resinas de troca iônica e produção de açúcar invertido. **Revista Horizonte Científico**. Uberlândia. 1-20 p., 2008.

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

CAMPELLO, G. S.; TRINDADE, R. A.; RÊGO, T. V.; BURKERT, J. F. M.; BURKERT, C. A. V. Immobilization of β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* on Eupergit® C and Properties of the Biocatalyst. **International Journal of Food Engineering**, v. 8, p. 1-17, 2012. <https://doi.org/10.1515/1556-3758.2760>

CAO, L. Immobilised enzymes: science or art. **Current Opinion in Chemical Biology**. v. 9, p. 217-226, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2005.02.014>

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**, Brasília, v.40, n.11, p.1123-1128, nov. 2005.

CASTRO, F.P.; CUNHA, T.M.; OGLIARI, P.J.; TEOFILO, R.F.; FERREIRA, M.M.C.; PRUDENCIO, 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. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2008.12.010>

CASTRO, H. F.; SILVA, M. L. C. P.; SILVA, G. L. J. P. Evaluation of inorganic matrixes as supports for immobilization of microbial lipase. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 17, p. 849-857, 2000. <https://doi.org/10.1590/S0104-66322000000400048>

CHANALIA, P.; GANDHI, D.; ATTRI, P.; DHANDA, S. Purification and characterization of β -galactosidase from probiotic *Pediococcus acidilactici* and its use in milk lactose hydrolysis and galactooligosaccharide synthesis. **Bioorganic Chemistry**, v. 77 p. 176–189, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2018.01.006>

CHANDRAPALA, J.; WIJAYASINGHE, R.; VASILJEVIC, T. Lactose crystallization as affected by presence of lactic acid and calcium in model lactose systems. **Journal of Food Engineering**, v. 178, p. 181-189, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2016.01.019>

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

COENEN, T.M.M.; BERTENS, A.M.C.; HOOG.S.C.M.; VERSPEEK-RIP, C.M. **Food and Chemical Toxicology**, v. 38, p. 671-677, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0278-6915\(00\)00053-3](https://doi.org/10.1016/S0278-6915(00)00053-3)

COSTA, S. A.; AZEVEDO, H. S.; REIS, R. L. Enzyme Immobilization in Biodegradable Polymers for Biomedical Applications. **Biodegradable Systems in Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, p. 301-323, 2005. DOI: 10.1201/9780203491232.ch1

COSTA, H. B. C. **Imobilização de α -galactosidase de *Aspergillus niger* em resina de troca iônica Duolite A-568**. 2012. Dissertação de mestrado. Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.

DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, G. M.; SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lípases imobilizadas em polímeros. **Química Nova**, v.27, n.4, p.623-630. 2004. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422004000400017>

DAIRY EXPORT COUNCIL, **Permeado de soro de leite e permeado de leite dos EUA**. USDEC-América do Sul, Brasil. Disponível em: www.thinkusadairy.org/Documents/Microsites/Portuguese/pt_2017%20Permeate.pdf. Acesso em: Novembro de 2016.

DATTA, S.; CHRISTENA, L. R.; RAJARAM, Y. R. S. Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. **3 Biotech**, v. 3, p. 1-9, 2013. Doi:[10.1007/s13205-012-0071-7](https://doi.org/10.1007/s13205-012-0071-7)

DEKKER, P.J.T.; DAAMEN, C.B.G., in: J.W. Fuquay (Ed.), **Encyclopedia of Dairy Science**, 2nd ed., Academic Press, London, p. 276–283, 2011. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374407-4.00152-7>

ERICH, S.; KUSCHEL, B.; SCHWARZ, T.; EWERT, J.; BOHMER, N.; NIEHAUS, F.; ECK, J.; LUTZ-WAHL, S.; STRESSLER, T.; FISCHER, L. Novel high-performance matagenome β -galactosidase for lactose hydrolysis in the dairy industry. **Journal of Biotechnology**, v. 210, p. 27-37, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2015.06.411>

FABER, K. **Biotransformations in Organic Chemistry**. Berlim: Springer, 2004. 5ª ed., 454p. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-18537-3>

FALLEIROS, L. N. S. S.; CABRAL, B. V. FISCHER, J. ; GUIDINI, C. Z. ; CARDOSO, V. L. ; RESENDE, M. M. ; RIBEIRO, E. J. Improvement of recovered activity and stability of the *Aspergillus oryzae* β -galactosidase immobilized on duolite A568 by combination of immobilization methods. **Chemical Industry & Chemical Engineering Quarterly**, p.1-10, 2017. <https://doi.org/10.2298/CICEQ160912010F>

FALLEIROS, L. N. S. S. **Imobilização e Estabilização de β -galactosidase por ligações multipontuais em Duolite A-568**. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, 98 p., 2012.

FALLEIROS, L. N. S. S. **Produção e caracterização de β -galactosidase *Kluyveromyces marxianus* ATCC 46537**. Tese de doutorado, Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, 150 p., 2016.

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

FENNEMA, O. R., DAMODARAN, S., PARKIN, K. L. **Química de Alimentos de Fennema**. 4 ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

FERREIRA, R. C. **Separação de α -lactoalbumina de β -lactoglobulina de proteínas de soro de queijo por adsorção em colunas de leito fixo**. 2001. Tese de Doutorado – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

FISCHER, J.; GUIDINI, C. Z.; SANTANA, L. N. S.; RESENDE, M. M.; CARDOSO, V. L.; RIBEIRO, E. J. Optimization and modeling of lactose hydrolysis in a packed bed system using immobilized β -galactosidase from *Aspergillus oryzae*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 85-86, 178-186, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2012.09.008>

FLORES, M.V.; VOGET, C.E.; ERTOLA, R.J.J. Permeabilization of yeasts cells (*Kluyveromyces lactis*) with organic solvents. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 16, n. 4, p. 340-346, 1994. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(94\)90177-5](https://doi.org/10.1016/0141-0229(94)90177-5)

FOX, P. F.; MC SWEENEY, P.L.H. Dairy Chemistry and Biochemistry, First Edition, London:Thomson Science, 378 p. 1998.

FREITAS, M. F. M. **Produção de β -galactosidase por *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y1564 em soro de leite e imobilização em quitosana**. Dissertação de mestrado em Engenharia Química. Universidade Federal do Ceará, CE – Brasil, 2013.

FURIGO, A. JR.; PEREIRA, E. B. **Cinética enzimática**. Santa Catarina: Universidade Federal de Santa Catarina, 2001. Apostila.

GALVÃO C. M. A. **Hidrólise Controlada de Proteínas do Soro Láctico usando Tripsina e Quimotripsina Imobilizadas em Diferentes Suportes**. Tese de Doutorado. Departamento de Engenharia Química. Universidade Federal de São Carlos (DEQ/UFSCAR), 2004.

GANJU, S.; GOGATE, P. R. A review on approaches for efficient recovery of whey proteins from dairy industry effluents. **Journal of Food Engineering**, v. 215, p. 84-96, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.07.021>

GARCIA-GALAN, C.; BERENQUER-MURCIA, A.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; RODRIGUES, R. C. Potential of Different Enzyme Immobilization Strategies to Improve Enzyme Performance. **Advanced Synthesis & Catalysis**, v. 353, n. 16, p. 2885-2904, Nov 2011. <https://doi.org/10.1002/adsc.201100534>

GASPARIN, F. S. R.; CARVALHO, J. M. T.; ARAUJO, S. C. Alergia à proteína do leite de vaca versus intolerância à lactose: as diferenças e semelhanças. **Revista Saúde e Pesquisa**, Maringá, v. 3, n. 1, p. 107-114, 2010.

GEIGER, B.; NGUYEN, H. M.; STEFANIE WENIG, S.; NGUYEN, H. A.; LORENZ, C.; KITTL, R.; MATHIESEND, G.; EIJSINK, V. G.H.; HALTRICHA, D.; NGUYENA, T. From by-product to valuable components: Efficient enzymatic conversion of lactose in whey using β -galactosidase from *Streptococcus thermophilus*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 116, p. 45–53, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2016.04.003>

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

GIOVANINI, G. T. **Produção, liofilização, purificação e determinação de especificidade da peptidase isolada do fungo *Scopulariopsis koningii***. 2014. Dissertação de mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto. <https://doi.org/10.11606/D.60.2014.tde-30102014-144336>

GOLOWCZYC, M.; VERA, C.; SANTOS, M.; GUERRERO, C.; CARASI, P.; ILLANES, A. Use of whey permeate containing in situ synthesised galacto-oligosaccharides for the growth and preservation of *Lactobacillus plantarum*. **Journal of Dairy Research**, v. 80, p. 374-381, 2013. <https://doi.org/10.1017/S0022029913000356>

GOMEZ, L., RAMIREZ H. L., VILLALONGA M. L., HERNANDEZ J., VILLALONGA R. Immobilization of chitosan-modified invertase on alginate-coated chitin support via polyelectrolyte complex formation. **Enzyme and Microbial Technology**, 2005. DOI: [10.1016/j.enzmictec.2004.10.008](https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2004.10.008)

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.

GONZÁLEZ-DELGADO, I.; LOPEZ-MUÑOZ, M. J.; MORALES, G.; SEGURA, Y. Optimisation of the synthesis of high galacto-oligosaccharides (GOS) from lactose with β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. **International Dairy Journal**, v. 61, p. 211-219, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2016.06.007>

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

GUIDINI, C.Z.; FISCHER, J.; SANTANA, L.N.S.; CARDOSO, V.L.; RIBEIRO, E.J. Immobilization of *Aspergillus oryzae* β -galactosidase in ion exchange resins by combined ionic-binding method and *cross-linking*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 52, p. 137-143, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2010.07.013>

GUIDINI, C. Z.; FISCHER, J.; RESENDE, M. M.; CARDOSO, V. L.; RIBEIRO, E. J. β -Galactosidase of *Aspergillus oryzae* immobilized in an ion exchange resin combining the ionic binding and crosslinking methods: Kinetics and stability during the hydrolysis of lactose. **Journal Of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, v.71, p. 139–145, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2011.04.010>

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

GÜNERKEN, W.; D'HONDT, E.; EPPINK, M.H.M.; GARCIA-CONZALEZ, L.; ELST, K.; WIJFFELS, R.H. Cell disruption for microalgae biorefineries. **Biotechnology Advances**, v. 33, 243-260, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.01.008>

GÜRDAZ, S.; GÜLEÇ, H. A.; MUTLU, M. Immobilization of *Aspergillus oryzae* β -galactosidase onto Duolite A568 Resin via Simple Adsorption Mechanism. **Food Bioprocess Technol**, v. 5, p. 904–911, 2012. <https://doi.org/10.1007/s11947-010-0384-7>

HAGE, D. S., CHROMATOGR, J., ANA, L B. Technol. Biomed. **Life Sci**, v.3, p. 768, 2002.

HAIDER, T.; HUSAIN, Q. Hydrolysis of milk/whey lactose by β 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. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2008.02.007>

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. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2011.09.011>

HARRIS, E.L.L. **Protein purification methods: a practical approach**. 2 ed. Nova York: Oxford; 2001.

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 β -galactosidase from *Aspergillus oryzae*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 24, p.161-172, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2005.02.011>

HEIDTMANN, R. B.; DUARTE, S. H.; PEREIRA, L. P.; BRAGA, A. R. C. Caracterização cinética e termodinâmica de β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 fracionada com sulfato de amônio. **Brasilian Journal of Food Technology**, v. 15, n. 1, p. 41-49, 2012. <https://doi.org/10.1590/S1981-67232012000100005>

HENLEY, J. P.; SADANA, A. Categorization of enzyme deactivations using a series typemechanism. **Enzyme Microb. Technology**. v. 7, p. 50-60, 1985. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(85\)90013-4](https://doi.org/10.1016/0141-0229(85)90013-4)

HETTIARACHCHY, N.S.; FELIZ, D.J.;EDWARDS, J.S.;HORAX, R. The use of immobilized enzymes to improve functionality. **Proteins in Food Processing**. 2018. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100722-8.00022-X>

HOLSINGER, V.H.;WONG, P.N; JENNES,R.; KEENEY,M.; MARTH,E.H. Lactose. **In: Fundamentals of Dairy Science**. New York, Van Nostrand Reinhold. 3 ed. p. 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. https://doi.org/10.1007/978-1-4757-4409-5_1

HRONSKÁ, H.; GROSOVA, Z.; ROSENBERG, M. Hydrolysis of lactose in milk by *Kluyveromyces lactis* β -galactosidase immobilized in polyvinylalcoholgel. **Journal of Food and Nutrition Research**, v. 48, n. 2, p. 87-91, 2009.

HU, K.; DICKSON, J.M. Membrane Processing for Dairy Ingredient Separation. **John Wiley and Sons Ltd.**, 2015. <https://doi.org/10.1002/9781118590331>

HUSAIN, Q. β -galactosidases and their potential applications: A review. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 30, n. 1, p.41-62, 2010. <https://doi.org/10.3109/07388550903330497>

INCHAURRONDO, V. A.; YANTORNO, O. M.; VOGET, C. E. Yeast growth and β -galactosidase production during aerobic batch cultures in lactose-limited synthetic medium. **Process Biochemistry**, v. 29, p. 47-54, 1994. [https://doi.org/10.1016/0032-9592\(94\)80058-8](https://doi.org/10.1016/0032-9592(94)80058-8)

IKEGAKI, M. e PARK, Y. K. Produção de lactosacarose por β -frutofuranosidase de *Bacillus sp* n^o417 a partir de lactose e sacarose. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 17, 188-191, 1997. <https://doi.org/10.1590/S0101-20611997000200023>

INSUMOS. **Intolerância a lactose e produtos lácteos com baixo teor de lactose**. São Paulo: Editora Insumos. Disponível em: www.insumos.com.br/aditivos_e_ingredientes/. Acesso em novembro/2017.

ISMAIL, S. A.; MABROUK, S. S.; MAHONEY, R. R. Purification and characterization of β -galactosidase from *Mucor pusill* US. **Journal of Food Biochemistry**, v. 21, p. 145-162, 1997. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4514.1997.tb00220.x>

JOCHEMS, P.; SATYAWALI, Y.; ROY, S. V.; DOYEN, W.; DIELS, L.; DEJONGHE, W. Characterization and optimization of β -galactosidase immobilization process on a mixed matrix membrane. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 49, p. 580– 588, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2011.06.010>

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

KAMRAN, A.; BIBI, Z.; AMAN, A.; QADER, S.A.U. Lactose hydrolysis approach: Isolation and production of β -galactosidase from newly isolated *Bacillus* strain B-2. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 5, p. 99-103, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2015.12.010>

KAREL, S. F.; LIBICKI, S. B.; ROBERTSON, C. R. The Immobilization of whole cells: Engineering principles.**Chemical Engineering Science**. v. 40, p. 1321-1354, 1985. [https://doi.org/10.1016/0009-2509\(85\)80074-9](https://doi.org/10.1016/0009-2509(85)80074-9)

KASPER, J. C.; FRIESS, W. The freezing step in lyophilization: Physico- chemical fundamentals, freezing methods and consequences on process performance and quality attributes of biopharmaceuticals. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. v. 78, p. 248–263, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2011.03.010>

KELLY, A. L. Milk biochemistry. In: GRIFFITHS, W. Improving the safety and quality of milk: V.1 Milk Production and Processing: Woodhead, Cap. 1, p. 2-26, 2010. <https://doi.org/10.1533/9781845699420.1.3>

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

KIELING, D. D. **Enzimas, aspectos gerais**. Centro Tecnológico Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Engenharia Química e de Alimentos, Florianópolis, 2002.

KISHORE, D.; KAYASTHA, A. M. A β -galactosidase from chick pea (*Cicer arietinum*) seeds: Its purification, biochemical properties and industrial applications. **Food Chemistry**, v. 134, p. 1113-1122, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.03.032>

KIRKPATRICK, K. J.; FENWICK, R. M. Manufacture and general properties of dairy ingredients. **Food Technology**, v. 41, n. 10, p. 58-65, Oct. 1987.

KLEIN, M. P. **Imobilização de β -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.

KLEIN, M. P.; HACKENHAAR, C. R.; LORENZONI, A. S. G.; RODRIGUES, R. C.; COSTA, T. M. H.; NINOW, J. L.; HERTZ, P. F. Chitosan crosslinked with genipin as support matrix for application in food process: Support characterization and β -d-galactosidase immobilization. **Carbohydrate Polymers**, v. 137, p. 184–190, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.10.069>

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.

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

LADERO, M.; PEREZ, M. T.; SANTOS, A.; GARCÍA-OCHOA, F. Hydrolysis of lactose by free and immobilized β -galactosidase from *Thermus* sp. strain T2. **Biotech. Bioeng.** v. 81, p. 241-252, 2002. <https://doi.org/10.1002/bit.10466>

LADERO, M.; SANTOS, A.; GARCIA-OCHOA, F. Kinetic modeling of lactose hydrolysis with an immobilized β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 27, p. 583-592, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(00\)00244-1](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(00)00244-1)

LANE, M.M., MORRISEY, J.P. *Kluyveromyces marxianus*: a yeast emerging from its sister's shadow. **Fungal Biology Reviews**, v. 2, p. 1-10, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2010.01.001>

LANE, M.M.; BURKE, N.; KARREMAN, R.; WOLFE, K. H.; O'BYRNE, C.; MORRISEY, J.P. Physiological and metabolic diversity in the yeast *Kluyveromyces marxianus*. *Antonie van Leeuwenhoek*, v.100, p. 507–519, 2011. <https://doi.org/10.1007/s10482-011-9606-x>

LAVARI, L.; IANNIELLO, R.; Páez, R.; ZOTTA, T.; CUATRIN, A.; REINHEIMER, J.; PARENTE, E.; VINDEROLA, G. Growth of *Lactobacillus rhamnosus* 64 in whey permeate and study of the effect of mild stresses on survival to spray drying. **Food Science and Technology**, p. 1-9, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.03.066>

LAVARI, L.; PAEZ, R.; CUATRIN, A.; REINHEIMER, J.; VINDEROLA, G. Use of cheese whey for biomass production and spray drying of probiotic *lactobacilli*. **Journal of Dairy Research**, v. 81 (3), p. 267-274, 2014. <https://doi.org/10.1017/S0022029914000156>

LEMES, A.C.; ÁLVARES, G.T.; KALIL, S.J. Extraction of β -galactosidase from *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 by ultrasonic method. **Biochemistry and Biotechnology Reports**, v. 1, n. 2, p. 7-13, 2012. DOI 10.5433/2316-5200.2012v1n2p7

- LEMES, A. C.; MACHADO, J. R.; BRITES, M. L.; LUCCIO, M.; KALIL, S. J. Design Strategies for Integrated β -Galactosidase Purification Processes. **Chemical Engineering Technology**. v.37, n. 10, p. 1805–1812, 2014. <https://doi.org/10.1002/ceat.201300433>
- LETCA, D.; HEMMERLING, C.; WALTER, M.; WULLBRAND, D.; BUCHHOLZ, K. Immobilization of Recombinant Inulase II from a Genetically Modified *Escherichia coli* Strain. **Roumanian Society of Biological Sciences**. v. 9, p. 1879-1886, 2004.
- LIMA, A. F.; CAVALCANTE, K. F.; FREITAS, M. F. M.; RODRIGUES, T. H. S.; ROCHA, M. V. P.; GONÇALVES, L. R. B. Comparative biochemical characterization of soluble and chitosan immobilized β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* NRRL Y1564. **Process Biochemistry**, v. 48, p. 443–452, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2013.02.002>
- LIMA, F. R.; ROCHA, L. O. F. Aproveitamento do soro de leite da produção do queijo do serro para fabricação de doce de leite: Viabilidade econômica. **Revista Inst. Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 71, n. 2, p. 83-93, 2016. <https://doi.org/10.14295/2238-6416.v71i2.526>
- LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotecnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos**. Sao Paulo: Ed. Edgard Blucher Ltda, 2001. v. 3, 593 p., 2001.
- LISBOA, C. R.; COSTA, F. A. A.; BURKERT, J. F. M.; BURKERT, C. A. V. Síntese de galacto-oligosacarídeos a partir de lactose usando β -galactosidase comercial de *Kluyveromyces lactis*. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 15, n. 1, p. 30-40, 2012. <https://doi.org/10.1590/S1981-67232012000100004>
- LIU, G.X.; KONG, J.; LU, W.W.; KONG, W.T.; TIAN, H.; TIAN, X.Y.; HUO, G.C. β -Galactosidase with transgalactosylation activity from *Lactobacillus fermentum* K4. **Journal Dairy Scientific**, v. 94, p. 5811–5820, 2011. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-4479>
- LIU, H.; LIU, J.; TAN, B.; ZHOU, F.; QIN, Y.; YANG, R. Covalent immobilization of *Kluyveromyces fragilis* β -galactosidase on magnetic nanosized epoxy support for synthesis of galacto-oligosaccharide. **Bioprocess Biosyst Eng**, v. 35, p. 1287–1295, 2012. <https://doi.org/10.1007/s00449-012-0716-2>
- 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.
- LORENTE, B.; MALPERTUY, A.; BLANDIN, G.; ARTIGUENAVE, F.; WINCKER, P.; DUJON, B. Genomic exploration of the hemiascomycetous yeasts: *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus*. **FEBS Letters**, v. 487, p. 71–75, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(00\)02283-3](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(00)02283-3)
- LUZ, G. B. Processo de extração das proteínas do soro de leite para produção do concentrado proteico. **Tecnologias para Competitividade Industrial**, Florianópolis, v. 9, n. 2, 2016.
- MADRID, V. A.; CENZANO, I.; VICENTE, J. M. **Manual de indústria dos alimentos**. São Paulo: Varela, 1996. p. 489-495.

MAHONEY, R.R. Galactosyl-oligosaccharide formation during lactose hydrolysis: a review. **Food Chemistry**, v. 63, n° 2, p. 147-154, 1998. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(98\)00020-X](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(98)00020-X)

MAHONEY, R. R. Lactose: Enzymatic Modification. In: Lactose, Water, Salts and Vitamins. **Advanced Dairy Chemistry**. London, v.3, p.77-125, 1997.

MANERA, A. P. **Síntese de galacto-oligossacarídeos a partir de células permeabilizadas de *Kluyveromyces marxianus***. 2010. 174 f. Tese de Doutorado – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

MANERA, A.P.; ORES, J.C.; RIBEIRO, V.A.; BURKERT, C.A.V; KALIL, S.J. Optimization of the Culture Medium for the production of β -Galactosidase from *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082. **Food Technology and Biotechnology**, v. 46, p. 66-72, 2008.

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

MARKOGLU, 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. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2007.10.018>

MARTINEK, K.; KLIBANOVAM, GOLDMACHER, V.S.; BEREZIN I.V. The principles of Enzyme stabilisation. 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.

MARTINS, A. R.; MANERA, A. P.; MONTEIRO, R. L.; BURKERT, J. F.M.; BURKERT, C. A. V. Lactose conversion and the synthesis of galactooligosaccharides in a simultaneous lagged bioprocess using β -galactosidases and probiotic microorganisms. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 14, n. 2, p. 130-136, 2011. <https://doi.org/10.4260/BJFT2011140200017>

MATTAR, R. e MAZO, D. F. C. Intolerância à Lactose: Mudança de Paradigmas com a Biologia Molecular. **Revista da Associação Médica Brasileira**. São Paulo. 56 v. 230-236 p., 2010.

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. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2007.01.018>

MEDEIROS, F.O.; ALVES, F.G.; LISBOA, C.R.; MARTINS, D.S.; BURKERT, C.A.V.; KALIL, S.J. Ondas ultrassônicas e pérolas de vidro: um novo método de extração de β -

galactosidase para uso em laboratório. **Química Nova**, v. 31, n. 2, p. 336-339, 2008. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422008000200028>

MEDEIROS, F. O. **Adsorção e purificação da enzima beta-galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 através de cromatografia de troca iônica**. 2008. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande, Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciências de Alimentos.

MICHELON, M.; MANERA, A.P.; CARVALHO, A.L.; FILHO, F.M. Concentration and purification of galactooligosaccharides using nanofiltration membranes. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 49, p. 1953-1961, 2014. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12582>

MILETIC, N.; NASTASOVIC, A.; LOOS, K. Immobilization of biocatalysts for enzymatic polymerizations: Possibilities. **Bioresource Technology**, v. 115, p. 126-135, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.11.054>

MOHAMAD, N.R., MARZUKI, N.H.C., BUANG, N.A., HUYOP, F., WAHAB, R.A. An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes. **Biotechnol. Equip.** 29 (2), 205–220, 2015. <https://doi.org/10.1080/13102818.2015.1008192>

MOLLEA, C., MARMO, L., BOSCO, F. **Valorization of cheese whey; a by-product from the dairy industry**. 2013.

MONTALTO M.; CURIGLIANO, V.; SANTORO, L.; VASTOLA, M.; CAMMAROTA, G.; MANNA, R.; GASBARRINI, A.; GASBARRINI, G. **World Journal of Gastroenterology**, v.12, p. 187–191, 2006. <https://doi.org/10.3748/wjg.v12.i2.187>

MORCHBÄCHER, A. P.; VOLPATO, G.; SOUZA, C. F. V. *Kluyveromyces lactis* β -galactosidase immobilization in calcium alginate spheres and gelatin for hydrolysis of cheese whey lactose. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.46, n.5, p.921-926, 2016. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20150833>

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.

MORENO-INDIAS, I.; CASTRO, N.; MORALES-DELANUEZ, A.; SÁNCHEZ-MACÍAS, D.; ASSUNÇÃO, P.; CAPOTE, J.; ARGÜELLO, A. Farm and factory production of goat cheese whey results in distinct chemical composition. **Journal of dairy science**, v. 92, n. 10, p. 4792-4796, 2009. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2215>

MOZHAEV, V.V.; MELIK-NUBAROV, N.S.; SERGEEVA, M.V.; SIKRIS, V.; MARTINEK, K. Strategy for stabilising enzymes. I. Increasing stability of enzymes via their multipoint interaction with a support. **Biocatalysis and Biotransformation**, v.3, n.3, p.179–187, 1990. <https://doi.org/10.3109/10242429008992060>

MUZA, S. F.; PERES, A. P.; DEGÁSPARI, C. H. Desenvolvimento de iogurte enriquecido com proteína do soro de leite. **Cadernos da Escola de Saúde**, Curitiba, v. 11, p. 79-89, 2014.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014. 1328 p.

NISHA, S., ARUM, K.S., GOBI, N. A review on methods, application and properties of immobilized enzyme. *Chem. Sci. Rev. Let.* 1 (3), 148–155, 2012.

NIU, D., TIAN, X., MCHUNU, N.P., JIA, C., SINGH, S., LIU, X., PRIOR, B.A., LU, F. Biochemical characterization of three *Aspergillus niger* β -galactosidases. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 27, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2017.03.001>

NOVO NORDISK. Publicação. **Enzymes Process Division**. Bioindustrial Group. 1993.

NUMANOGLU, Y.; SUNGUR, S. β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* cell disruption and enzyme immobilization using a cellulose-gelatin Carrier system. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 703-709, 2004. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(03\)00183-3](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(03)00183-3)

OGURI, R. T. **Estudo de condições operacionais na produção de penicilina G acilase por diferentes microrganismos**. 2007. 113 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos – SP.

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 β -galactosidases and their Use in Galactoside Synthesis. **Journal of Molecular Catalysis A:Chemical**. v. 134, p. 267-274, 1998. [https://doi.org/10.1016/S1381-1169\(98\)00045-4](https://doi.org/10.1016/S1381-1169(98)00045-4)

OZDURAL, 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. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2008.02.002>

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. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612005000200026>

PANDIT, A.B.; HARRISON, S.; FARKADE, V.D. Heat induced translocation of proteins and enzymes within the cell: an effective way to optimise the microbial cell disruption process. **Biochemical Engineering Journal**, v. 23, p. 247-257, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2005.01.001>

PANESAR, P.S.; KENNEDY, J.F.; GANDHI, D.N.; BUNKO, K. Bioutilisation of whey for lactic acid production, **Food Chemistry**, v. 105, p. 1–14, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.03.035>

PANESAR, P. S.; KUMARI, S.; PANESAR, R. Potential Applications of Immobilized β -Galactosidase in Food Processing Industries. **Enzyme Research**, v.2010, 16 p., 2010. [Doi:10.4061/2010/473137](https://doi.org/10.4061/2010/473137)

- PATEL R. N.; Microbial enzymatic synthesis of chiral intermediates for pharmaceuticals. **Enzyme and Microbial Technology**, v.31, p. 804-826, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(02\)00186-2](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(02)00186-2)
- PARASHAR, A.; JIN, Y.; MASON, B.; CHAE, M.; BRESSLER, D.C. Incorporation of whey permeate, a dairy effluent, in ethanol fermentation to provide a zero waste solution for the dairy industry. **Journal of Dairy Science**, v. 99, p. 1859–1867, 2016. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10059>
- 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.
- PINHEIRO, R.; BELO, I.; MOTA, M. Growth and β -galactosidase activity in cultures of *Kluyveromyces marxianus* under increased air pressure. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 37, p. 438-442, 2003. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.2003.01429.x>
- PIZARRO A. V. L., PARK E. Y.; Lipase-catalysed production of biodiesel fuel from vegetable oils contained in waste activated bleaching earth. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 1077-1082, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(02\)00241-8](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(02)00241-8)
- POLSHETTIWART, V.; LUQUE, R.; FIIHRI, A.; ZHU, H.; BOUHRARA, M.; BASSET, J. M. Magnetically Recoverable Nanocatalysts. **Chemical Review**, v. 11, p. 3036-3075, 2011. <https://doi.org/10.1021/cr100230z>
- 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. <https://doi.org/10.5380/cep.v23i1.1278>
- PRAKASHAM, R.S.; SUBBA RAO, CH.; SREENIVAS RAO, R.; SARMA, P.N. Alkaline protease production by an isolated *Bacillus circulans* under solid-state fermentation using agroindustrial waste: process parameters optimization. **Biotechnology Progress**, v. 21, p. 1380–1388, 2005. <https://doi.org/10.1021/bp050095e>
- PRAZERES, A.R.; CARVALHO, F.; RIVAS, J. Cheese whey management: A review. **Journal of Environmental Management**, v. 110, 48-68, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2012.05.018>
- 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.
- PURI, M.; GUPTA, S.; PAHUJA, P.; KAUR, A.; KANWAR, J. R.; KENNEDY, J. F. Cell disruption optimization and covalent immobilization of β -D-galactosidase from *Kluyveromyces marxianus* YW-1 for lactose hydrolysis in milk. **Appl Biochem Biotechnol**, v. 160 p. 98-108. 2010. <https://doi.org/10.1007/s12010-009-8542-y>
- QURESHI, N.; FRIEDL, A.; MADDOX, I.S. Butanol production from concentrated lactose/whey permeate: use of pervaporation membrane to recover and concentrate product,

Applied Microbiology and Biotechnology, v. 98 (23), p. 9859–9867, 2014. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6117-5>

RABELO, A.P.B.; TAMBOURGI, E.B.; PESSOA JR, A. Bromelain partitioning in two phase aqueous systems containing PEO-PPO-PEO block copolymers. **Journal of Chromatography**, v. 807,p. 61-8, 2005.

RAIMOND, S.; AMARETTI, A.; PALLESCHI, C.; UCCELLETTI, D.; ROSSI, M. Thermal adaptability of *Kluyveromyces marxianus* in recombinant protein production. *Microbial Cell Factories*, p. 2-7,2013. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-12-34>

RAO, C.H.S.; SATHISH, T.; MAHALAXMI, M.; LAXMI, G.S.; RAO, R.S.; PRAKASHAM, R.S. Modeling and optimization of fermentation factors for enhancement of alkaline protease production by isolated *Bacillus circulans* using feed-forward neural network and genetic algorithm. **Journal of Applied Microbiology**, v. 104, p. 889–898, 2008. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03605.x>

RECH, R. **Aproveitamento do soro de queijo para a produção de lactase por *Kluyveromyces marxianus***. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 1998.

REGULY, J. C. **Biotecnologia dos processos fermentativos**. V. 3. Pelotas: Editora e Gráfica Universitária - UFPEL, 2000.

RENNER, E. **Milk and Dairy Products in Human Nutrition**. Germany: W. G. Motty, University of Glessen, Munich, p. 1-450, 1983.

RIANI, J.C. **Utilização de resinas de troca-iônica em efluentes de galvanoplastia**. Tese de Doutorado – Escola Politécnica da Universidade de São Paulo. Departamento de Engenharia Metalúrgica e de Materiais. São Paulo, 121 p, 2008. <https://doi.org/10.11606/T.3.2008.tde-30092008-151250>

RICHARDS, N.S.P.S. Soro Lácteo – Perspectivas Industriais e Proteção ao Meio Ambiente. **Food Ingredients**, n. 17, p. 20-27, 2002.

ROSA, P.R.F.; SANTOS, S.C.; SILVA, E.L. Different ratios of carbon sources in the fermentation of cheese whey and glucose as substrates for hydrogen and ethanol production in continuous reactors. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 39, p. 1288–1296, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2013.11.011>

ROSEVEAR, A. Immobilized Biocatalysts – a critical review. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology B – Biotechnology**, Oxford, v. 34, n. 3, p. 127-150, 1984. <https://doi.org/10.1002/jctb.280340302>

RUBIO-TEXEIRA, M. Endless versatility in the biotechnological applications of *Kluyveromyces* LAC genes. **Biotechnology Advances**, v. 24, p. 212-225, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2005.10.001>

SALAZAR, O.; ASENJO, J. A. Enzymatic lysis of microbial cells. **Biotechnology Letters**, v. 29, p. 985-994, 2007. <https://doi.org/10.1007/s10529-007-9345-2>

SANTIAGO, P.A., MARQUEZ, L.D.S., CARDOSO, V.L., RIBEIRO, E.J. Estudo da Produção de β -Galactosidase por Fermentação de Soro de Queijo com *Kluyveromyces marxianus*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas – Brazil, v. 24, p. 567-572, 2004.

SCHOLZ, E. B. **Estudo cinético de *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 a partir de fontes alternativas de carbono e nitrogênio visando à síntese se β -galactosidase**. 2011. Dissertação de mestrado – Mestrado em Engenharia de Processos. Universidade da Região de Joinville. Joinville.

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

SEMRAD, C.E.; POWELL, D.W. Approach to the patient with diarrhea and malabsorption. In: **Goldman L, Ausiello D**, editors. Cecil medicine. 23rd ed. Philadelphia: Saunders, p.1019-42, 2008. DOI: [10.1016/B978-1-4377-1604-7.00142-1](https://doi.org/10.1016/B978-1-4377-1604-7.00142-1)

SENER, N., KILIC, D., OZBEK, A. B. A modelling study on milk lactose hydrolysis and β -galactosidase stability under sonication. *Process Biochemistry*, v.41, n. 7, p.1493–1500, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2006.02.008>

SGARBIERI, V.C. Propriedades fisiológicas-funcionais das proteínas do soro de leite. **Revista de Nutrição**, Campinas, n. 17 (4), p. 397-409, 2004. <http://dx.doi.org/10.1590/S1415-52732004000400001>

SILVA, C. A.; GOMES, J. P.; SILVA, F. L. H.; MELO, E. S. R. L.; CALDAS, M. C. S. Utilização de soro de leite na elaboração de pães: Estudo da qualidade sensorial. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v.13, n. Especial, p.355-362, 2011

SILVA, G.; SILVA, A. M. A.; FERREIRA, M. P. B. **Produção Alimentícia: Processamento do Leite**. Recife. EDUFRPE, 2012. 172 p.

SILVA, P. H. F. Aspectos de Composição e Propriedades. **Química Nova na Escola-Leite**, nº 6, 1997.

SILVÉRIO, S. C.; MACEDO, E. A.; TEIXEIRA, J. A.; RODRIGUES, L. R. New β -galactosidase producers with potential for prebiotic synthesis. *Bioresource Technology*, v. 250, p.131-139, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.11.045>

SIRISHA, V.L.; JAIN, A.; JAIN, A. Enzyme Immobilization: An Overview on Methods, Support Material, and Applications of Immobilized Enzymes. **Advances in Food and Nutrition Research**, p. 1-33, 2016. <https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2016.07.004>

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, 1991. [https://doi.org/10.1016/0958-6946\(92\)90022-E](https://doi.org/10.1016/0958-6946(92)90022-E)

SHELDON, R. A. Enzyme Immobilization: The Quest for Optimum Performance. **Advanced Synthesis & Catalysis** v. 349, p. 1289-1307, 2007. <https://doi.org/10.1002/adsc.200700082>

SHELDON, R. A.; VAN PELT, S. Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 15, p. 6223-6235, 2013. <https://doi.org/10.1039/C3CS60075K>

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.

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

SMITH, S. T.; METZGER, L.; DRAKE, M. A. Evaluation of whey, milk, and delactosed permeates as salt substitutes. **American Dairy Science Association**[®], v. 99, p. 1-12, 2016. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-10904>

SOLEIMANI, M., KHANI, A., NAJAFZADEH, K. α -Amylase immobilization on the silica nanoparticles for cleaning performance towards starch soils in laundry detergents. **Journal of Molecular Catalysis B Enzymatic**, 74, 1-5, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2011.07.011>

SONG, C.; LIU, G. L.; XU, J. L.; CHI, Z. M. Purification and characterization of extracellular β -galactosidase from the psychrotolerant yeast *Guehomyces pullulans* 17-1 isolated from sea sediment in Antarctica. **Process Biochemistry**, Amsterdam, v. 45, p. 954-960, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2010.02.025>

SRIVASTAVA, A.; MISHRA, S.; CHAND, S. Transgalactosylation of lactose for synthesis of galacto-oligosaccharides using *Kluyveromyces marxianus* NCIM 3551. **New Biotechnology**, v. 4, n. 4, p. 412-418, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2015.04.004>

SZCZODRAK, J. Hydrolysis of Lactose in whey Permeate by Immobilized β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. **Journal Of Molecular Catalysis B-Enzymatic**. v. 10, p. 631-637, 2000. [https://doi.org/10.1016/S1381-1177\(00\)00187-9](https://doi.org/10.1016/S1381-1177(00)00187-9)

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

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. <https://doi.org/10.1590/S0102-09352008000100033>

TOMAL; A. A. B.; CUNHA, M. E. T.; BOSSO, A.; YOUSSEF, E.; SUGUIMOTO, H. H. Avanços Tecnológicos na Obtenção, Purificação e Identificação de Galactooligosacarídeos e Estudo de suas propriedades Prébióticas. UNOPAR Científica. **Ciências Biológicas e da Saúde**; v.12, 41- 49, 2010.

TORRES, D.P.M.; GONÇALVES, M.P.F.; TEIXEIRA, J.A.; RODRIGUES, L.R. Galacto-oligosaccharides: production, properties, applications, and significance as prebiotics. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 9, p. 438-454. 2010. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2010.00119.x>

TRONCO, V. M. **Manual para Inspeção da Qualidade do Leite**. 3. ed. Santa Maria: Editora Universidade Federal de Santa Maria, 2008.

USDA, United States Department of Agriculture. **Dairy: World Markets and Trade**. 2017.

USTOK, F.I; TARI, C; HARSA, S. Biochemical and thermal properties of β -galactosidase enzymes produced by artisanal yogurt cultures. *Food chem.*,v.119, p.1114-1120, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.08.022>

VALLE, T. A. **Ácido lactobiônico produzido por *Zymomonas mobilis*: uma alternativa para vetorização de drogas**. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual de Joinville, Joinville. 2009.

VASILEVA, N.; IVANOV, Y.; DAMYANOVA, S.; KOSTOVA, I.; GODJEVARGOVA, T. Hydrolysis of whey lactose by immobilized β -galactosidase in a bioreactor with a spirally wound membrane. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 82, p. 339-346, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.11.025>

VERA, C.; GUERRERO, C.; CONEJEROS, R.; ILLANES, A. Synthesis of galacto-oligosaccharides by β -galactosidase from *Aspergillus oryzae* using partially dissolved and supersaturated solution of lactose. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 50, 188-194, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2011.12.003>

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

VIJAYAKUMAR, J.; ARAVINDAN, R.; VIRUTHANGIRI, T. Recent trends in the production, purification and application of lactic acid., **Chemical and Biochemical Engineering Quarterly**, v. 22, p. 245-264, 2008

XIA, Y.; ZHAO, J.; CHEN, H.; LIU, X.; WANG, Y.; TIAN, F.; ZHANG, H.P.; ZHANG, H.; CHEN, W. Extracellular secretion in *Bacillus subtilis* of a cytoplasmic thermostable beta-galactosidase from *Geobacillus stearothermophilus*. **Journal of Dairy Science**, v. 93, p. 2838–2845, 2010. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2864>

WALSTRA, P.; WOUTERS, J. T. M.; GEURTS, T. J. Dairy Science and Technology. Taylor & Francis. 2 ed. 146 p. 2006.

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

WEETALL H. H. Immobilized Enzymes and their Application in the Food and Beverage Industry. **Process Biochemistry**. p. 3-30, 1975.

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

YOU, S.; CHANG, H.; YIN, Q.; QI, W.; WANG, M.; SU, R.; HE, Z. Utilization of whey powder as substrate for low-cost preparation of β -galactosidase as main product, and ethanol

as by-product, by a litre-scale integrated process. **Bioresource Technology**, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.08.092>

YU, L.; O'SULLIVAN, D.J. Production of galactooligosaccharides using a hyperthermophilic β -galactosidase in permeabilized whole cells of *Lactococcus lactis*. **Journal of Dairy Science** v. 97, p. 694–703, 2014. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-7492>

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.

ANEXO

ANEXO A

 FUNDAÇÃO ANDRÉ TOSELLO <small>INSTITUTO DE PESQUISA E TECNOLOGIA</small>	Coleção de Culturas Tropical www.cct.fat.org.br	Fundação André Tosello www.fat.org.br R. Latino Coelho, 1301 - Pq. Tupuna CEP 13087-010 - Campinas, SP Fone/Fax: (19) 3242-7572 Fax: (19) 3242-7837 CNPJ 46.126.322/0001-62
---	---	--

CERTIFICADO

A Coleção de Culturas Tropical – CCT certifica, para os devidos fins, que o microrganismo abaixo é uma linhagem referência ATCC (American Type Culture Collection, USA), conforme consta nos dados referentes ao seu histórico registrados no Catálogo de Linhagens da CCT, 1996 (<http://fat.org.br/servic/pequisa.htm>).

CCT	Microrganismo	Referência	Lote
4085	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	ATCC 46537	T0911-H

Ref. Catálogo de Linhagens, Coleção de Culturas Tropical – CCT, Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia André Tosello, 1ª Ed., 1996.

Microrganismo de 1ª passagem

Referência CCT: OS 130208

Todas as linhagens do acervo passam por rotina de controle de qualidade. Caso haja ocorrência de problemas com a cultura reativada, o solicitante deverá contactar a CCT no prazo de até 15 dias a partir da data de entrega da cultura, para que seja feita a reposição da mesma. O prazo de validade das linhagens em seu sítio original é de um mês, a partir da data de incubação, desde que estocada sob temperatura controlada de 2 a 8°C e utilizados os métodos técnicos específicos para sua manipulação. A CCT se comprometerá a substituir culturas liofilizadas no período de até 3 meses após seu envio.


M^{te} Josiane Conti
Coleção de Culturas CCT/FAT
E-mail: josi@fat.org.br

Campinas, 06 de Maio de 2013.

ANEXO B



Especificação Técnica

Permeado de Soro de Leite em Pó

E1824
Revisão 03

Produto	Aplicações
<p>Produto obtido da filtração por membranas de ultrafiltração retido até a proteína de soro, concentrado em evaporador a vácuo e seco através do processo tipo spray-dryer.</p>	<p>O permeado de soro de soro de leite em pó pode ser utilizado nas aplicações de biscoitos, pães, chocolates, queijos processados entre outros.</p>
Ingredientes	Embalagem
<p>Permeado de Soro de Leite Resíduo. Não contém Glúten</p>	<p>Sacos de papel multilaminado com soro de polietileno interno, contendo 25 kg. Pallet P&H 1100kg.</p>
Características Sensoriais	Condições de Armazenamento e Transporte
<p>Pó uniforme sem grumos. Sabor e odor lácteos. Cor branco a amarelado.</p>	<p>Armazenamento à temperatura ambiente, ao abrigo da luz e calor, em local fresco e arejado. Transportar protegido contra umidade e calor, não devendo ser transportado com outros materiais que possam de alguma forma contaminar o produto.</p>

Parâmetros Físico Químicos			Informações Nutricionais	
	Mínimo	Máximo	Porção de 100g	
Umidade (%)	-	3	Valor Calórico	370 kcal
Acidez (% ácido láctico) ¹	-	2	Carboidratos	90 g
pH	6,0	6,7	Proteínas	2,0 g
Cinzas (% sais minerais)	-	6	Gorduras Totais	<0,05g
Lactose (%)	88	-	Gorduras Saturadas	<0,05g
Proteína (%)	1,5	-	Gorduras Trans	<0,05g
			Fibras Alimentares	<0,10g
			Sódio	674 mg
			Calcio	530 mg

Parâmetros Microbiológicos		Validade
	Máximo	<p>Armazenado nas condições recomendadas, 12 meses a partir da data de fabricação.</p> <p>Monitoramento O monitoramento de contaminantes (Antibióticos, Pesticidas, Metais pesados, Micotoxinas, Microorganismos Patogênicos e Moléculas Exógenas) é realizado de acordo com o Plano de Amostragem Interno e Legislações Vigentes.</p>
Aeróbios Mesófilos (UFC/g)	5x10 ⁷	
Coliformes Totais (UFC/g)	1x10 ⁷	
Coliformes Fecais (UFC/g)	1x10 ⁷	
Staphylococcus aureus (UFC/g)	1x10 ⁷	
Salmonella (25g)	Ausente*	
Bacillus cereus (UFC/g)	Máx 1 x 10 ⁷	

Registro no Ministério da Agricultura nº 0118122P

ACEITE DO CLIENTE

<p>Empresa: <i>Indústria Laticínios do Brasil</i></p> <p>Nome: <i>Andressa Kelly de Jesus</i></p> <p>Função: <i>Sócia proprietária</i></p>	<p>Data: <i>07/05/2015</i></p> <p>Visto: <i>[Assinatura]</i></p>
--	--

Fone +55 (45) 3284-5300

Sooro Concentrada Indústria de Produtos Lácteos Ltda

Caixa Postal 1066 - CEP 85962-000 - Rodovia BR 163 km 277 - Marechal Cândido Rondon - Paraná

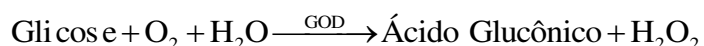
www.sooro.com.br

APÊNDICE

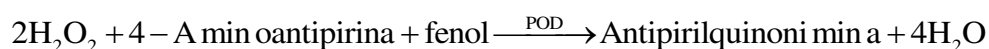
APÊNDICE A

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 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 490 e 520 nm.

Na Tabela abaixo está descrito um esquema de como devem ser preparadas as amostras para se determinar o teor de glicose.

Tabela – Teste glicose-oxidase			
	Branco	Teste	Padrão
Amostra	--	0,02 mL	--
Padrão	--	--	0,02 mL
Reagente 1	2,0 mL	2,0 mL	2,0 mL

Misturar vigorosamente e incubar em banho-maria a 37 +/- 2°C durante 10 minutos. Após esse tempo, as amostras eram lidas as absorvâncias a 505 nm em espectrofotômetro, considerando como branco o Reagente 1. Com os valores de absorvância em função da absorvância da amostra padrão (Equação) obtêm-se a concentração de glicose.

$$Glicose \left(\frac{mg}{dL} \right) = \frac{Absorvância \ do \ Teste}{Absorvância \ do \ Padrão} \times 100$$

Assim foi possível determinar a concentração de glicose usando o kit Labtest.

APÊNDICE B

A concentração celular foi obtida por massa seca, 150 mL do caldo fermentado foram retiradas do reator e centrifugado sob refrigeração (27 200 g, 4 °C, 10 minutos), o sobrenadante era descartado, o decantado era ressuspendido em água deionizada e colocadas em estufa a uma temperatura de 80°C até que sua massa permanecesse constante. A massa seca era obtida pela diferença entre a massa final e a massa do recipiente.

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

Absorbância	Concentração de Células g.L ⁻¹
0,698	0,31410
0,603	0,26175
0,504	0,20940
0,381	0,15705
0,260	0,10470
0,197	0,07852
0,163	0,06282
0,133	0,05235
0,102	0,03926
0,062	0,03141

