



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS

IMOBILIZAÇÃO DE β -GALACTOSIDASE PRODUZIDA POR *BACILLUS LICHENIFORMIS* PARA APLICAÇÃO EM INDÚSTRIA LÁCTEA

Lilian Mayumi Kuribayashi

Patos de Minas/MG

Fevereiro 2019



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS

IMOBILIZAÇÃO DE β -GALACTOSIDASE PRODUZIDA POR *BACILLUS LICHENIFORMIS* PARA APLICAÇÃO EM INDÚSTRIA LÁCTEA

Lilian Mayumi Kuribayashi

Orientadora: Milla Gabriela dos Santos

Coorientadoras: Carla Zanella Guidini

Larissa Nayhara Soares Santana Falleiros

Dissertação de mestrado apresentada
ao Programa de Pós-Graduação em
Engenharia de Alimentos da
Universidade Federal de Uberlândia
campus Patos de Minas como parte
dos requisitos necessários à obtenção
do título de Mestre em Engenharia de
Alimentos, área de concentração em
Processos Biotecnológicos.

Patos de Minas – MG

Fevereiro 2019

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

K96I
2019

Kuribayashi, Lilian Mayumi, 1985-
Imobilização de β -galactosidase produzida por *Bacillus licheniformis* para aplicação em indústria láctea [recurso eletrônico] / Lilian Mayumi Kuribayashi. - 2019.

Orientadora: Milla Gabriela dos Santos.

Coorientadoras: Carla Zanella Guidini e Larissa Nayhara Soares Santana Falleiros.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos.

Modo de acesso: Internet.

Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2019.352>

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

1. Alimentos - Indústria. 2. Beta-galactosidase. 3. *Bacillus licheniformis*. 4. Lactose. I. Santos, Milla Gabriela dos, 1984- (Orient.). II. Guidini, Carla Zanella, 1983- (Coorient.). III. Falleiros, Larissa Nayhara Soares Santana, 1988- (Coorient.). IV. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos. IV. Título.

CDU: 664

Maria Salete de Freitas Pinheiro - CRB6/1262



ATA

Ata de Defesa de Dissertação de Mestrado junto ao Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos – PPGEA, da Faculdade de Engenharia Química – FEQUI, da Universidade Federal de Uberlândia - UFU.

Defesa de Dissertação de Mestrado n. 02/2019 do Curso de Mestrado em Engenharia de Alimentos (1.40.09.01) - PPGEA

Data:	13 de fevereiro de 2019
Horário de início:	14:00
Horário de encerramento:	16:00
Discente:	Lílian Mayumi Kuribayashi
Matrícula:	41712EAL008
Título do Trabalho:	Imobilização de β -Galactosidase produzida por <i>Bacillus Licheniformis</i> para aplicação em indústria láctea
Área de concentração:	Engenharia de Alimentos
Linha de pesquisa:	Processos Biotecnológicos

Reúne-se na Sala 22 do Prédio Pavonianos, *campus* Patos de Minas da Universidade Federal de Uberlândia, a Banca Examinadora aprovada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos, assim composta: Profa. Dra. Milla Gabriela dos Santos (Orientadora/UFU), Profa. Dra. Líbia Diniz Santos (UFU) e Profa. Dra. Janaína Fischer (UPF/RS).

Iniciando os trabalhos a presidente da mesa, Profa. Dra. Milla Gabriela dos Santos, apresentou a Banca Examinadora e a discente, agradeceu a presença do público e concedeu à última a palavra, para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação da discente se deu em conformidade às normas do Programa.

A seguir, a senhora presidente concedeu a palavra às examinadoras, que passaram a arguir a discente. Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos legais, a Banca Examinadora, em sessão secreta, atribuiu o conceito final, considerando a discente **APROVADA**.

Esta defesa de Dissertação de Mestrado Acadêmico integra os requisitos à obtenção do título de Mestre em Engenharia de Alimentos. O competente diploma será expedido após o cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos às 16 horas e 00 minutos. Foi lavrada a presente ata que, após lida e aprovada, será assinada pelos membros da Banca Examinadora.

Patos de Minas, 13 de fevereiro de 2019.

Professora Doutora Milla Gabriela dos Santos (FEQUI/UFU)

Professora Doutora Líbia Diniz Santos (FEQUI/UFU)

Professora Doutora Janaína Fischer (UPF/RS)



Documento assinado eletronicamente por **Milla Gabriela dos Santos, Presidente**, em 13/02/2019, às 15:55, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Líbia Diniz Santos, Membro de Comissão**, em 13/02/2019, às 15:56, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Janaína Fischer, Usuário Externo**, em 13/02/2019, às 15:56, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1000911** e o código CRC **73EC6F7A**.

Dedico esta dissertação primeiramente a Deus, pois sem Ele, nada seria possível, ao meu avô que está sempre olhando por mim e guiando meus passos, aos meus pais, Shinobu e Elsy, aos meus irmãos Juliane e Thiago e ao meu marido Milton; pela dedicação e compreensão durante essa e todas as outras caminhadas.

Muito Obrigada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus pelo dom da vida e por mais esta conquista.

Aos meus pais Shinobu e Elsy agradeço pela dedicação em me proporcionarem uma boa educação e me ensinarem o valor do trabalho e da responsabilidade.

Aos meus irmãos Juliana e Thiago agradeço todo o suporte durante toda a minha vida de irmã caçula e mais ainda nos últimos dois anos que foram muito intensos. Em especial agradeço à minha irmã por ter me dado o melhor presente, nossa Lulu.

Agradeço ao meu marido Milton por ter sido paciente durante as minhas ausências para estudar, ir para o laboratório e mais ainda na reta final de redação.

Agradeço a todos familiares e amigos pelo apoio, incentivo e torcida.

Aos amigos da Cemil agradeço por terem me dado o suporte necessário durante as minhas ausências, em especial à Juliana e ao Amado por me proporcionarem todas as condições para realizar o Mestrado.

Às professoras Milla, Carla e Larissa pela orientação impecável, amizade, confiança e incentivos constantes.

Às minhas novas amizades que o Mestrado me proporcionou Amanda, Cris, Lara e Vanessa, agradeço por terem sido apoios constantes desde o primeiro semestre até à reta final. E à Victoria pela parceria, dedicação, alto astral e toda ajuda concedida. Contem sempre comigo!

Aos professores e técnicos da Engenharia de Alimentos agradeço os ensinamentos, a paciência e a dedicação.

Agradeço à banca examinadora por terem aceito o convite e por contribuírem de forma enriquecedora para o trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Uberlândia *campus* Patos de Minas agradeço pela oportunidade concedida.

“A gente pode morar numa casa mais ou menos, numa rua mais ou menos, numa cidade mais ou menos, e até ter um governo mais ou menos.

A gente pode dormir numa cama mais ou menos, comer um feijão mais ou menos, ter um transporte mais ou menos, e até ser obrigado a acreditar mais ou menos no futuro.

A gente pode olhar em volta e sentir que tudo está mais ou menos.

Tudo bem!

*O que a gente não pode mesmo, nunca, de jeito nenhum
é amar mais ou menos, sonhar mais ou menos,
ser amigo mais ou menos, namorar mais ou menos,
ter fé mais ou menos, e acreditar mais ou menos.
Senão a gente corre o risco de se tornar uma pessoa mais ou menos.”*

Chico Xavier

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	ii
RESUMO	iii
ABSTRACT	iv
Capítulo 1 – Introdução	5
Capítulo 2 – Revisão Bibliográfica	7
2.1. Leite	7
2.2. Produção de leite no Brasil	8
2.3. Mercado de produtos com redução de lactose	9
2.4. Intolerância à lactose e a má absorção da lactose	9
2.5. Métodos de Redução da Lactose em Produtos Lácteos	11
2.6. β -galactosidase	13
2.7. Imobilização de enzimas	16
2.8. Tipos de imobilização	17
2.8.1. Imobilização por encapsulação	18
2.8.2. Imobilização por adsorção física e por ligação iônica	19
2.8.3. Imobilização por ligação covalente	20
2.9. Suportes para imobilização	21
Capítulo 3 – Material e Métodos	23
3.1. Material	24
3.1.1. Enzima	24
3.1.2. Suporte para imobilização	24
3.1.3. Unidade experimental	25
3.1.4. Preparação da solução de lactose	26
3.2. Método analítico	26
3.3. Métodos experimentais	27
3.3.1. Pré-tratamento das resinas	27
3.3.2. Processo de imobilização	28
3.3.3. Escolha do suporte	28
3.3.4. Influência da concentração de β -galactosidase na atividade da enzima imobilizada	28
3.3.5. Influência do tempo na atividade da enzima imobilizada	29
3.3.6. Influência da presença do substrato na atividade da enzima imobilizada	30
3.3.7. Influência do tampão e da força iônica na atividade da enzima imobilizada	31

3.3.8. Influência conjunta da concentração da enzima, força iônica e pH da solução de imobilização na atividade da enzima imobilizada.....	31
3.3.9. Influência de ligações cruzadas e multipontuais na atividade da enzima imobilizada	33
3.3.10. Estabilidade da enzima imobilizada	34
Capítulo 4 - Resultados e discussão	35
4.1. Escolha do suporte.....	35
4.2. Influência da concentração de β -galactosidase no processo de imobilização.	36
4.3. Influência do tempo na atividade da enzima imobilizada.	38
4.4. Influência da presença do substrato no processo de imobilização	40
4.5. Influência do tampão e da força iônica na atividade da enzima imobilizada	42
4.6. Influência conjunta da concentração da enzima, força iônica e pH da solução de imobilização na atividade da enzima imobilizada.....	43
4.7. Influência de ligações cruzadas e multipontuais na atividade da enzima imobilizada	50
4.8. Estabilidade da enzima imobilizada	51
Capítulo 5 – Conclusões.....	55
Capítulo 6 – Sugestões para trabalhos futuros	56
Capítulo 7 – Referências Bibliográficas	57

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1. Processos de Redução da Lactose em produtos lácteos	11
Figura 2.2. Estrutura da (a) Lactose, (b) Glicose e (c) Galactose.....	12
Figura 2.4. Principais métodos de imobilização de enzimas	17
Figura 3.1. Fluxograma ilustrativo das etapas do trabalho.....	23
Figura 3.2.(a) Resinas Duolite A568 e (b) Amberlite XAD761 utilizadas para imobilização da enzima β -galactosidase	24
Figura 3.3. Unidade experimental com reator tipo cesta.....	26
Figura 3.4. Testes preliminares para influência das ligações cruzadas e multipontuais na atividade da enzima imobilizada	33
Figura 4.1. Atividade enzimática em diferentes concentrações de enzima, utilizando o suporte Duolite A568 na quantidade de 0,5 g.	37
Figura 4.2. Influência do tempo de imobilização na atividade da enzima na forma livre, imobilizada e do sobrenadante da imobilização	38
Figura 4.3. Distribuição de resíduos relativos à atividade da enzima imobilizada	44
Figura 4.4. Distribuição dos resíduos relativos à atividade da enzima imobilizada após retirar os ensaios 12 e 13.	46
Figura 4.5. Valores preditos em relação aos observados da atividade da enzima imobilizada após retirar os ensaios 12 e 13.	46
Figura 4.6. Superfície de resposta da influência da concentração da enzima e da força iônica na atividade da enzima imobilizada.....	47
Figura 4.7. Superfície de resposta da influência da concentração da enzima e do pH na atividade da enzima imobilizada	47
Figura 4.8. Superfície de resposta da influência da força iônica e do pH na atividade da enzima imobilizada.....	48
Figura 4.9. Atividade relativa (U/U ₀) da β -galactosidase imobilizada e reticulada com 1,0 g.L ⁻¹ (●), 2,0 g.L ⁻¹ (■) e 3,5 g.L ⁻¹ (▲).	52
Figura 4.10. Atividade da enzima imobilizada (≡), imobilizada e reticulada 1,0 g.L ⁻¹ (⊗) e imobilizada e reticulada 3,5 g.L ⁻¹ (○), à 5°C, após 3 usos	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1. Características das resinas	25
Tabela 3.2. Matriz do Planejamento Composto Central Rotacional do efeito da concentração da enzima, força iônica e pH da solução de imobilização.....	32
Tabela 4.1. Atividade enzimática (U) da enzima imobilizada em Amberlite XAD761.	35
Tabela 4.2. Atividade enzimática (U) da enzima imobilizada em Duolite A568.....	36
Tabela 4.3. Efeito do tempo no processo de imobilização.	39
Tabela 4.4. Resultado da influência do tempo de imobilização na atividade da enzima imobilizada	40
Tabela 4.5. ANOVA para o tempo de imobilização.....	40
Tabela 4.6. Resultados do efeito da adição do substrato no processo de imobilização à temperatura ambiente (aproximadamente 25°C).	41
Tabela 4.7. Resultados do efeito da adição do substrato no processo de imobilização à 10 °C	41
Tabela 4.8. Resultado da influência do tampão e da força iônica na atividade da enzima imobilizada	42
Tabela 4.9. Matriz do Planejamento Composto Central Rotacional para imobilização de β -galactosidase com valores reais (codificados) e atividade da enzima imobilizada.....	43
Tabela 4.10. Coeficientes de regressão, erro padrão e nível de significância estatística (valor de p) dos fatores significativos do modelo para atividade da enzima imobilizada.	44
Tabela 4.11. Coeficientes de regressão, erro padrão e nível de significância estatística (valor de p) dos fatores significativos do modelo para atividade da enzima imobilizada, após retirar os ensaios 13 e 14.	45
Tabela 4.12. Resultado da influência da força iônica na atividade da enzima imobilizada	49
Tabela 4.13. ANOVA para força iônica	50
Tabela 4.14. Resultados dos experimentos para o processo de ligações cruzadas e multipontuais.	50
Tabela 4.15. Atividade da enzima imobilizada, à 40 °C, após 6 usos.	52
Tabela 4.16. Tempo de hidrólise da lactose, em horas, utilizando os biocatalisadores imobilizados à 5°C.....	53
Tabela 4.17. Atividade da enzima imobilizada no tempo 0 e após 36 dias de armazenamento à 4°C, em tampão BR 40 mM e pH 4,0.....	54

RESUMO

No Brasil não há um consenso sobre a prevalência da intolerância à lactose, mas estima-se que 40% a 60% da população seja intolerante à lactose. Nos últimos anos, a indústria alimentícia desenvolveu uma ampla gama de produtos com lactose reduzida objetivando que uma pessoa intolerante não desista de consumir produtos lácteos. A produção de leite com redução de lactose é feita utilizando a enzima β -galactosidase que tem a capacidade de quebrar a lactose em glicose e galactose. Enzimas são catalisadores de alto custo e o seu uso torna o processo oneroso. A imobilização é um processo de retenção de uma biomolécula no interior de um reator ou de um sistema analítico. A recuperação e reutilização de enzimas através de biocatalisadores imobilizados torna o processo economicamente viável, por isso tem sido considerada uma técnica promissora para tornar competitiva a aplicação de enzimas em larga escala. Neste trabalho foi estudada a imobilização da β -galactosidase de *Bacillus licheniformis* em resina de troca iônica. O processo de imobilização foi testado em resinas Duolite A568 e Amberlite XAD761, sendo que a Duolite A568 apresentou melhor retenção da atividade enzimática. A influência da concentração da enzima, do tempo e da presença do substrato no processo de imobilização foi testada preliminarmente. A melhor condição de imobilização foi: 43 $\text{mL}\cdot\text{L}^{-1}$ de enzima na solução de imobilização, 2 horas de reação e que o substrato no processo de imobilização não incrementou a atividade imobilizada. Na sequência foi avaliada a imobilização em diferentes tampões e forças iônicas e o tampão BR 20 mM foi escolhido para a sequência desta pesquisa por possuir uma ampla faixa de pH ajustável. Um Planejamento Composto Central Rotacional (PCCR) foi proposto para avaliar o processo de imobilização em relação as variáveis: concentração da enzima, força iônica e pH da solução de imobilização. As condições que maximizaram a resposta foram: força iônica de 40 mM, pH 4,0 e concentração da enzima em 43 $\text{mL}\cdot\text{L}^{-1}$. Posteriormente foi estudado a influência das ligações multipontuais na atividade da enzima imobilizada, utilizando solução tampão pH 9,0 a 25°C por 24 horas, e ligações cruzada com diferentes concentrações de glutaraldeído. Foi verificado que a etapa de estabilização interferiu drasticamente na atividade da enzima imobilizada, sendo inviável a utilização desta etapa nas condições experimentais deste trabalho. A reticulação com diferentes concentrações de glutaraldeído apresentou influência significativa na atividade da enzima imobilizada, sendo que maiores concentrações do glutaraldeído (3,5 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) impactou negativamente na atividade enzimática retida no suporte, mas demonstrou 92% e 69% de estabilidade em relação ao número de usos nas temperaturas de reação de 40°C e 5°C respectivamente. Por outro lado, a utilização de glutaraldeído em menor concentração (1,0 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) não afetou a atividade da enzima imobilizada e também não ofereceu boa estabilidade ao biocatalisador, atingindo a atividade relativa de 63% após 6 usos à 40°C e de 48% após 3 usos à 5°C. Por fim, os testes de armazenamento por 36 dias reafirmaram a teoria de que a utilização do glutaraldeído como agente reticulante melhora a estabilidade do biocatalisador imobilizado.

Palavras-chave: intolerância à lactose, β -galactosidase, *Bacillus licheniformis*, Duolite A568, imobilização de enzima.

ABSTRACT

In Brazil, there is no consensus about prevalence of lactose intolerance, although it is estimated to be between 40% and 60% of the population. In the last years, the food industry developed a wide range of lactose-reduced products aiming to allow the intolerant person to keep consuming dairy products. The lactose-reduced milk is produced with the enzyme β -galactosidase, which has the ability of breaking the lactose into glucose and galactose. Enzymes are expensive catalysts and their use burdens the cost of the whole process. The retention of a biomolecule inside of a reactor or analytical system is called immobilization. The recover and reuse of enzymes through immobilized biocatalyzers makes the process affordable; so, the enzymatic immobilization has been considered the most promising method to turn the use of enzyme in large-scale more competitive. The aim of this work was the study of immobilization of β -galactosidase of *Bacillus licheniformis* in ion exchange resin. The immobilization process was tested in Duolite A568 and Amberlite XAD761 resins. The Duolite A568 showed better retention of the enzymatic activity and was chosen to be used at this study. The influence of enzyme concentration, duration and substrate presence in the immobilization process was tested previously. The best condition of immobilization was: 43 $\text{mL}\cdot\text{L}^{-1}$ of enzyme in the immobilization solution, 2 hours of reaction and the substrate didn't improve the immobilized activity at this process. Then, the immobilization was evaluated in different buffers with diverse ionic strengths. The best result was obtained with BR 20 mM buffer because of its wide range of adjustable pH. A Central Composite Rotational Design (CCRD) was proposed to evaluate the immobilization process for the variables: enzymatic concentration, ionic strength and pH of the immobilization solution. The conditions that maximize the response are: ionic strength of 40 mM, pH 4.0 and enzymatic concentration of 43 $\text{mL}\cdot\text{L}^{-1}$. Then, the influence of multipoint attachment on the activity of immobilized enzyme was studied by using buffer solution pH 9.0 at 25°C for 24h. The influence of cross-linking through the use of glutaraldehyde in different concentrations as reticulant agent was also assessed. The stabilization step drastically impacted the activity of the immobilized enzyme, making the use of this step impossible at the experimental conditions of this study. The reticulation with different concentrations of glutaraldehyde showed significant influence on the activity of the immobilized enzyme; higher reagent concentrations (3.5 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) negatively impacted the enzymatic activity on the support, but showed stability of 92% and 69% related to number of uses in temperatures of reaction of 40°C and 5°C, respectively. On the other hand, the use of glutaraldehyde at lower concentrations (1.0 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) didn't affect the activity of the immobilized enzyme and didn't show good stability to the biocatalyzer, achieving the relative activity of 63% after 6 uses at 40°C and 48% after 3 uses at 5°C. At last, the storage tests for 36 days corroborated the theory that the use of glutaraldehyde as reticulant agent improves the stability of the immobilized biocatalyzer.

Keywords: lactose intolerance, β -galactosidase, *Bacillus licheniformis*, Duolite A568, enzyme immobilization.

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO

O leite é um alimento composto por nutrientes fundamentais à manutenção da saúde e a lactose é o principal carboidrato presente nele. De acordo com Pereira et al. (2012), 65% da população mundial apresentam intolerância à lactose, ou seja, tem dificuldade para digerir esse carboidrato após ingerirem leite e derivados.

Existem no mercado produtos alternativos com teores reduzidos de lactose, capazes de suprir as necessidades nutricionais de pacientes diagnosticados com intolerância à lactose (MATTAR; MAZO, 2010). Dentre esses produtos podemos destacar os iogurtes, queijos duros e leites processados com baixos teores de lactose. Esse é um nicho de mercado em expansão, favorável para investimento das indústrias lácteas (ROSA; RÉVILLION, 2011). De acordo com Rocha e Roepcke (2015), o Brasil foi responsável por 29% dos lançamentos de produtos com redução de lactose na América Latina entre 2010 e 2014, e segundo Sato (2016) há um claro aumento na porcentagem de novas bebidas e produtos alimentícios que se posicionam “sem ou com redução de lactose”. O banco global de dados de novos produtos da Mintel (Global New Products Database - GNPD) mostrou que 5,9% dos lançamentos no Brasil, em 2015, de alimentos e bebidas, trouxeram informações na embalagem indicando quantidade reduzida, ou ausência, de lactose. Comparando com os anos anteriores, esse percentual foi de 3,8% em 2014 e 3,1%, em 2013.

Para a obtenção de produtos lácteos com baixos teores de lactose, a indústria láctea faz uso da enzima β -galactosidase. Esta enzima ocorre amplamente na natureza podendo ser isolada de animais, plantas ou microrganismos. A produção dessa enzima a partir de microrganismos é a forma mais importante tecnologicamente e com maiores rendimentos. Os parâmetros enzimáticos e os custos da enzima são os atributos que determinam a tecnologia a ser utilizada e os custos relativos do processo de hidrólise da lactose (AYAZ; ALNAHDI; DANIAL, 2011).

Normalmente, o custo da β -galactosidase é bastante elevado. A imobilização da enzima deve superar este problema uma vez que, quando imobilizada, ela pode ser reutilizada várias vezes, o que diminui os custos do processo (AYAZ; ALNAHDI; DANIAL, 2011).

A enzima β -galactosidase obtida a partir de *Bacillus licheniformis* na forma livre possui condições ótimas de temperatura entre 45°C e 50°C e pH entre 6,0 e 7,0 (MAIR, 2010; AYAZ; ALNAHDI; DANIAL, 2011 e JUAJUN et al., 2011). Esta condição de pH é próxima ao pH do leite o que torna essa enzima apta na produção de leite com reduzido teor de lactose. Apesar

Capítulo 1 – Introdução

de ser uma enzima com características de aplicação ideais para leite, poucos trabalhos foram publicados sobre a imobilização de β -galactosidase de *Bacillus licheniformis*.

Para a reação de hidrólise da lactose podem ser utilizados diferentes tipos de reatores, os quais destacam-se os reatores por batelada (ou descontínuos) e o reator de leito fixo, que podem ser facilmente reproduzidos em escala industrial. Os reatores de leito fixo são equipamentos muito utilizados na indústria química, principalmente em reações catalíticas. O controle efetivo desses reatores é fundamental para se obter operações seguras, especialmente quando alto desempenho é desejado (TOLEDO, 1999).

O reator batelada não realiza alimentação e nem saída do material antes do término do processo. O substrato e a enzima são introduzidos simultaneamente no início da reação. À medida que a reação se processa, a concentração de substrato decresce e a concentração de produto aumenta. Este reator é mais utilizado quando se está trabalhando com enzimas na forma livre e solúvel. Após o surgimento de enzimas imobilizadas, este tipo de reator foi usado em processos onde se desejava uma fácil separação ao final do processo da enzima imobilizada e do meio (CHIBATA, 1978; ROSEVEAR; KENNEDY; CABRAL, 1987).

O objetivo deste trabalho é imobilizar a enzima β -galactosidase de *Bacillus licheniformis* em resinas de troca iônica utilizando glutaraldeído como agente reticulante e como objetivos específicos deste trabalho podem ser citados:

- Estudar a influência da concentração de β -galactosidase e do tempo no processo de imobilização;
- Estudar a influência conjunta da força iônica e pH do tampão e da quantidade de enzima ofertada no processo de imobilização;
- Estudar a influência de uso de tampões estabilizadores e glutaraldeído na estabilidade da enzima imobilizada;
- Estudar a estabilidade do biocatalisador em relação ao número de usos em reatores batelada;
- Estudar a estabilidade do biocatalisador em relação ao armazenamento.

CAPÍTULO 2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Leite

O leite de vaca é considerado um alimento completo, sendo de grande importância na alimentação humana contribuindo com carboidratos, proteínas, lipídios, vitaminas e minerais de alto valor nutricional. De acordo com a Instrução Normativa 62 de 29 de Dezembro de 2011 (BRASIL, 2011), entende-se por leite, sem outra especificação, o produto oriundo da ordenha completa e ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas, e segundo o Decreto nº 9.013 de 29 de março de 2017, art. 248 (BRASIL, 2017) o leite deve atender alguns requisitos básicos como teor mínimo de lactose de 4,3g/100g e índice crioscópico entre -0,530°H e -0,555°H (equivalentes a -0,512°C e a -0,536°C respectivamente), dentre outros enumerados na norma.

Os constituintes do leite ocorrem em três fases: solução, suspensão coloidal e emulsão. A maior parte solúvel do leite é uma combinação de lactose, sais orgânicos e inorgânicos, vitaminas hidrossolúveis e proteínas do soro. As caseínas se encontram como grandes agregados coloidais, variando em diâmetro de 50 a 600 nm. E emulsionados na fase aquosa estão os lipídios, glóbulos que variam de 1,5 a 10 μm de diâmetro e as vitaminas lipossolúveis (ORDÓÑEZ, 2005; FOX et al., 2015).

Sua composição não é constante e a variabilidade é influenciada por fatores genéticos, como a espécie, a raça do animal, fatores fisiológicos como a fase da lactação, fatores de sanidade em situações em que o animal é afetado por alguma patologia e fatores ambientais e de manejo, como o clima, a alimentação ou o sistema de ordenha (RENHE; PERRONE; SILVA, 2011).

Os precursores da síntese de gordura do leite resultam do acúmulo de gordura corporal no tecido adiposo ou dos triacilgliceróis presentes na corrente sanguínea, que são produzidos a partir dos ácidos graxos voláteis sintetizados no rúmen derivados da alimentação a base de forragens pelas vacas (SIMILI; LIMA, 2007).

A síntese de lactose a partir de glicose e da galactose depende da ação da enzima lactose sintetase (galactosil transferase + α -lactoalbumina) e sua liberação no lúmen ocorre em equilíbrio com a passagem de sais, principalmente cloreto, uma vez que o leite deve ser sintetizado em isotonía com o sangue animal, impondo uma limitação fisiológica à composição do leite. Ao final da lactação e em casos de infecções (mamite), ocorre aumento na passagem de constituintes do sangue para o leite, via rota paracelular, o que ocasiona mudança na

Capítulo 2 – Revisão Bibliográfica

composição (menor concentração de lactose, maior concentração de cloreto e soro proteínas) e mudança nas propriedades físico-químicas como diminuição na estabilidade térmica do leite, afetando a produtividade industrial (RENHE; PERRONE; SILVA, 2011).

As proteínas do leite podem ser separadas em dois grandes grupos: as caseínas e as proteínas do soro. A caseína é uma fosfoproteína relativamente hidrofóbica encontrada na forma de micelas (DEPETERS; CANT, 1992) e sintetizada a partir das células epiteliais da glândula mamária (SOUSA, 2015). Dentre as principais proteínas do soro quatro se destacam e entre estas, duas são sintetizadas na glândula mamária (β -lactoglobulina e a α -lactalbumina) e as outras duas são de origem do sangue (albumina sérica e imunoglobulinas). Além destas citadas, encontram-se no soro outras proteínas como a lactoferrina, transferrina e enzimas (plasmina, lipase lipoprotéica e fosfatase alcalina) (MEPHAN et al., 1992).

2.2. Produção de leite no Brasil

O Brasil aumentou a sua produção de leite a um ritmo de 2,7% ao ano no período 2012 – 2015 (CONAB, 2017), situação que favoreceu a indústria láctea. Porém, em 2016, devido às condições climáticas relacionadas ao El Niño, a produção global de leite na América do Sul caiu 4% (FAO, 2017) e no Brasil a queda foi de aproximadamente 3,7% (CONAB, 2017). Em 2017, os laticínios que atuam sob algum tipo de serviço de inspeção sanitária captaram 24,12 bilhões de litros, representando um aumento de 4,1% em relação ao ano anterior. É a primeira retomada depois de dois anos seguidos de queda na série histórica anual da aquisição de leite (IBGE, 2018).

De acordo com informações preliminares de 2018 do IBGE as perspectivas não são promissoras, comparando o acumulado dos três primeiros trimestres de 2017 e 2018, foi verificado uma estagnação com leve queda de 0,2% na produção de leite. Ao comparar cada trimestre separadamente, no primeiro trimestre de 2018 houve um aumento na produção de leite de 2,6% em relação ao mesmo período do ano anterior, enquanto no segundo semestre houve uma queda de 3% e de 0,3% no terceiro trimestre (IBGE, 2018). Presume-se que o resultado ruim acumulado até setembro de 2018 pode estar relacionado à greve dos caminhoneiros que aconteceu em maio de 2018.

Segundo o IBGE (2013), estima-se que a população brasileira em 2027 será de 220 milhões de pessoas. Para atender essa população, considerando a demanda atual de cerca de 170 litros de lácteos/habitante/ano (ZOCCAL, 2016), a produção anual deverá ultrapassar os 37 bilhões de litros de leite. Apesar de figurar um volume expressivo, a disponibilidade de leite

Capítulo 2 – Revisão Bibliográfica

per capita no Brasil ainda é pequena considerando à de países desenvolvidos, cujo poder aquisitivo da população é mais elevado e a média de consumo nesses países alcança 220 litros/habitante/ano (ZOCCAL, 2016).

2.3. Mercado de produtos com redução de lactose

A tendência de saúde e bem-estar trouxe a questão das intolerâncias alimentares e alergias à vanguarda das mentes dos consumidores modernos. Um número crescente culpa a lactose, pelo menos em parte, pelo desconforto digestivo experimentado após as refeições. A fim de reduzir a inchaço e o constrangimento causado pela acumulação de gás intestinal, a cada dia mais consumidores estão recorrendo a produtos especializados. Globalmente, lácteos e sorvetes sem lactose obtiveram ganhos de valor de 10% em 2015 (EUROMONITOR, 2016).

Nos últimos anos, a indústria alimentícia desenvolveu uma ampla gama de produtos de alta qualidade, baixa lactose e até sem lactose para substituir o leite normal, preservando o restante dos nutrientes dos alimentos, o objetivo é que uma pessoa intolerante não tenha que desistir de consumir produtos lácteos (UGIDOS-RODRÍGUEZ; MATALLANA-GONZÁLEZ; SÁNCHEZ-MATA, 2018).

É previsto que as vendas globais de alimentos sem lactose vão continuar a crescer a uma taxa anual média de 6% ao ano ao longo do período de 2015 a 2020, atingindo US\$ 8,8 bilhões em 2020. Os laticínios sem lactose, que devem desfrutar de um crescimento médio ao ano ligeiramente superior a 7%, serão responsáveis por 80% deste montante (BAROKE, 2016).

2.4. Intolerância à lactose e a má absorção da lactose

A diminuição na síntese de lactase no organismo humano é devido à menor expressão genética, e não ao baixo consumo de produtos lácteos, como se pensava anteriormente (GREGORIO, 2013). Quando a intolerância à lactose foi descrita pela primeira vez em 1963, parecia ser uma ocorrência incomum, surgindo apenas ocasionalmente na população branca, visto que a capacidade de digerir a lactose (lactentes persistentes) foi mensurada em indivíduos a partir de uma ampla variedade de origens étnicas e raciais, ficando evidente que o desaparecimento da enzima lactase logo após o desmame (ou pelo menos durante a primeira infância) era, na verdade, a condição (normal) predominante na maior parte da população do mundo (MAHAN; ESCOTT-STUMP; RAYMOND, 2012).

Capítulo 2 – Revisão Bibliográfica

Ao longo da história da humanidade, alguns indivíduos desenvolveram uma mutação genética que lhes permitiu continuar com a capacidade de digerir lactose na fase adulta da vida. Esse evento foi observado em algumas populações que domesticavam o gado para consumo de carne e que eventualmente bebiam o leite para matar a fome ou até mesmo a escassez de água (ANTUNES; PACHECO, 2009).

A deficiência de lactase no organismo é classificada em três tipos: congênita, primária e secundária. A deficiência congênita é rara, herdada e autossômica recessiva, pois a quantidade de lactase neste caso é muito baixa ou até mesmo ausente. Caso o diagnóstico não seja precoce, pode levar o recém-nascido ao óbito. O recém-nascido apresenta diarreia líquida ao ser amamentado ou receber fórmulas que contenham lactose (MATTAR; MAZO, 2010).

A intolerância à lactose mais frequente é a deficiência primária da lactase conhecida como hipolactasia adulta, que se caracteriza por uma alteração no gene que codifica a lactase e sua manifestação é decorrente de fatores hereditários. Essa deficiência vem desde a infância podendo ser por falta relativa ou definitiva da enzima lactase (GASPARIN; TELES; ARAÚJO, 2010).

Ainda que muitas pessoas tenham capacidade de manter a secreção da enzima necessária para a quebra da lactose, existe um grande número de pessoas que se tornam intolerantes a esse açúcar em alguma etapa da vida (ZACARCHENCO; VAN DENDER; REGO, 2017), essa intolerância é conhecida como intolerância à lactose secundária, que se desenvolve como consequência de infecção do intestino delgado, doenças inflamatórias, HIV ou desnutrição. Em crianças, normalmente é secundária a infecções virais ou bacterianas (MAHAN; ESCOTT-STUMP; RAYMOND, 2012).

A má absorção da lactose intestinal pode ocorrer por dois tipos de condições que podem ser estabelecidas de acordo com o grau de atividade da lactase: alactasia (ausência total de atividade da lactase) e hipolactasia (atividade de lactase muito baixa na mucosa jejunal, com um desequilíbrio entre a quantidade de lactose ingerida e a capacidade para hidrolisar) (UGIDOS-RODRÍGUEZ; MATALLANA-GONZÁLEZ; SÁNCHEZ-MATA, 2018). A intolerância à lactose depende não apenas da expressão da lactase, mas também da dose de lactose, flora intestinal, motilidade gastrointestinal, supercrescimento bacteriano do intestino delgado e sensibilidade do trato gastrointestinal à geração de gás e outros produtos de fermentação da digestão da lactose (DENG et al., 2015).

No Brasil não há um consenso sobre a prevalência da intolerância à lactose, já que é um país conhecido pela miscigenação e variabilidade geográfica, mas estima-se que entre 40% e 60% da população seja intolerante à lactose (Associação Brasileira da Indústria de Leite Longa

Capítulo 2 – Revisão Bibliográfica

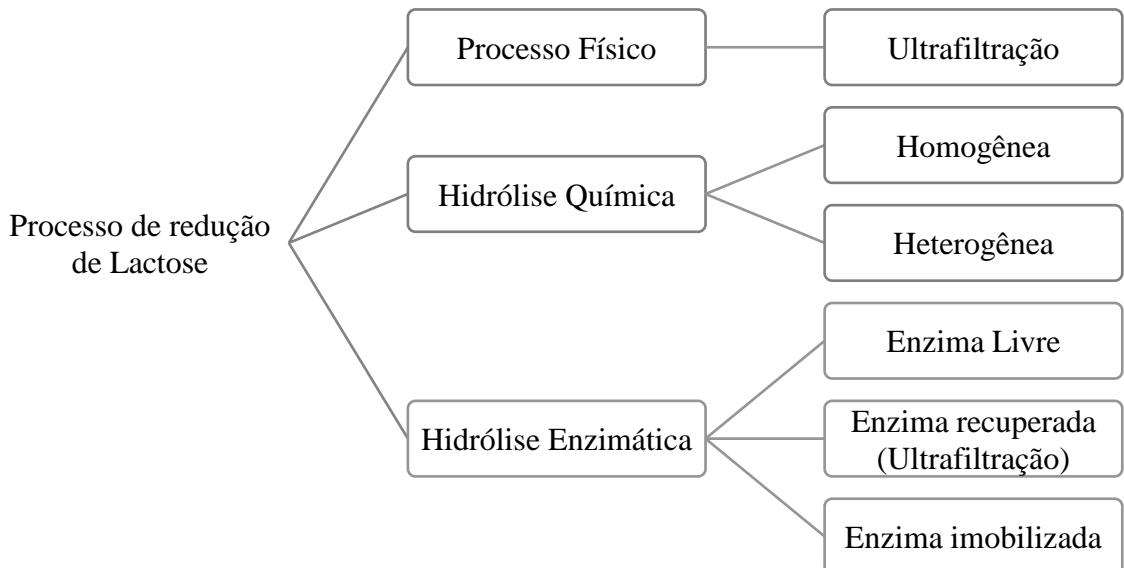
Vida – ABLV, 2016) porém, existem vários graus de intolerância à lactose, por isso, alguns indivíduos, mesmo com a intolerância, conseguem ingerir pequenas quantidades de leite ou derivados, enquanto outros não toleram nem ao menos pequenas quantidades (BRASIL, 2016).

O tratamento em indivíduos intolerantes à lactose consiste basicamente em excluir produtos lácteos em suas dietas, causando um problema, pois esses alimentos são fontes primárias de cálcio e o corpo perde quantidades consideráveis desse mineral diariamente. Outra opção é o consumo de produtos lácteos com baixo teor de lactose, que são uma alternativa para as pessoas intolerantes, com destaque para os lácteos fermentados, queijos duros e leites e seus derivados com teor de lactose reduzido, produto obtido através de hidrólise da lactose por meio de usos de enzimas β -galactosidase (MATHIÚS et al., 2016).

2.5. Métodos de Redução da Lactose em Produtos Lácteos

A redução da lactose em produtos lácteos pode ocorrer por meio da separação física através de membranas ou através de reações de hidrólise, seja por meio da forma enzimática ou química conforme mostrado na Figura 2.1.

Figura 2.1. Processos de Redução da Lactose em produtos lácteos



Fonte: Adaptado de HOBMAN, 1984.

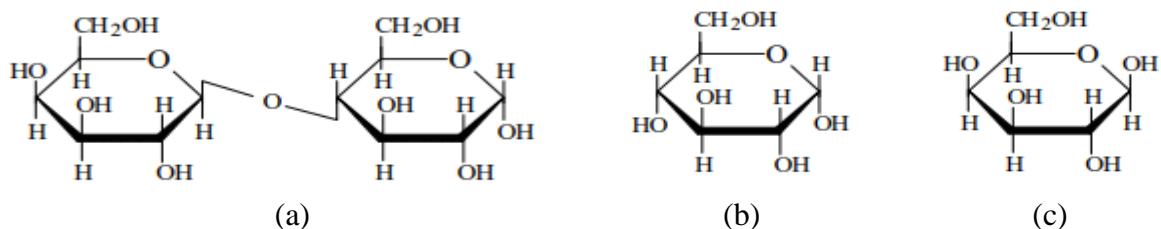
A redução da lactose através do método de ultrafiltração (UF) é uma alternativa que utiliza tecnologia de membranas para separação da lactose com massa molecular de corte 1000 a 500000 Daltons (permeado), das gorduras e proteínas do leite que ficam retidas (retentado).

Capítulo 2 – Revisão Bibliográfica

No processo de UF pode ocorrer perdas de minerais tais como o cálcio, que, por possuírem tamanho menor, podem passar pelos poros da membrana assim como a lactose (LIMSAWAT; PRUKSASRI, 2010).

Os demais métodos de redução da lactose citados se baseiam na teoria da quebra da molécula de lactose em duas outras moléculas menores, glicose e galactose. As estruturas da lactose, galactose e glicose estão representadas na Figura 2.2.

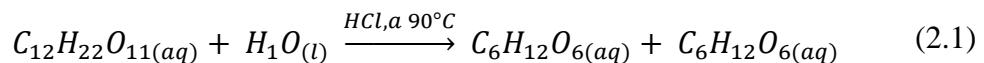
Figura 2.2. Estrutura da (a) Lactose, (b) Glicose e (c) Galactose



Fonte: ZADOW, 1984

A hidrólise da lactose pode ser aplicada para obter produtos destinados aos consumidores intolerantes à lactose, prevenir cristalização na produção de sorvete, na produção de fermentados, como iogurte, e em leite condensado. Dependendo do nível da hidrólise, o leite com lactose hidrolisada terá um gosto ligeiramente mais doce, isto é causado pelo poder adoçante mais elevado da glicose e da galactose em comparação com a lactose (OBÓN et al., 2000).

A hidrólise ácida é uma alternativa pouco explorada para redução do teor de lactose em leites e derivados devido ao rigor necessário das condições de operação, baixo pH, alta temperatura (aproximadamente 90°C), ocasionando perda de constituintes nutricionais, alterações sensoriais e formação de subprodutos que deverão ser purificados (CARMINATTI, 2001). A hidrólise ácida ocorre conforme apresentado na Equação 2.1.



A hidrólise enzimática através do uso da enzima β -galactosidase é um dos métodos mais interessantes para redução do teor de lactose no leite e seus derivados. A vantagem desse

Capítulo 2 – Revisão Bibliográfica

método reside no fato de que a reação se processa a temperaturas numa faixa que pode variar de 4 a 40°C e não são formados subprodutos, como ocorre na hidrólise ácida (LONGO, 2006).

Para a produção de leite longa vida com redução de lactose o processamento pode ocorrer de duas formas: na primeira, o leite cru passa por tratamento térmico de esterilização (141°C / 5 segundos) e depois do resfriamento, adiciona-se a lactase estéril para então o leite ser envasado em embalagens assépticas, desta forma, a hidrólise da lactose ocorre no interior da embalagem.

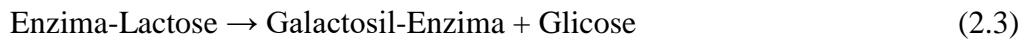
No outro método, o leite cru passa por uma pasteurização para eliminação dos principais microrganismos patogênicos, e, após o resfriamento a temperaturas próximas à 5°C, a lactase é adicionada. Essa temperatura está abaixo da temperatura ideal de eficiência da enzima, que é entre 35 e 40°C, logo o processo de hidrólise leva mais tempo, podendo chegar a 48 horas de reação. Este controle de temperatura é importante para prevenir o crescimento da flora bacteriana, principalmente de origem psicrotrófica que podem afetar o leite por ação de enzimas termorresistentes (lipases e proteases). Neste método, a hidrólise ocorre dentro de tanques de armazenamento e o monitoramento conversão da lactose em glicose e galactose ocorre através de análises apropriadas. Após a redução da lactose à níveis pré-definidos, realiza-se a esterilização do leite e o envase asséptico (LONGO, 2006; USME; JARAMILLO; ÁLVAREZ, 2013).

2.6. β -galactosidase

Enzimas são biocatalisadores de natureza proteica ou glicoproteínas, que atuam de forma a acelerar uma reação bioquímica, reduzindo a energia de ativação, sem alterar o equilíbrio da reação. Com enzimas, a catálise é realizada em condições brandas e na maioria das vezes em soluções aquosas, sob pressão e temperaturas amenas. Essas são algumas características que fazem as enzimas diferenciarem dos catalisadores químicos, sendo a principal delas o seu alto grau de especificidade em relação ao substrato (VIEIRA, 2009).

A enzima β -galactosidase (E.C.3.2.1.23) ou lactase, catalisa a hidrólise da lactose liberando quantidades equimolares de galactose e glicose. Wallenfels e Malhotra (1962) propuseram um mecanismo geral da ação da β -galactosidase na hidrólise da lactose envolvendo pelo menos três etapas:

Capítulo 2 – Revisão Bibliográfica



A β -galactosidase tem diversas origens, sendo que os microrganismos são considerados a fonte mais adequada para aplicação industrial (GEKAS; LOPEZ-LEIVA, 1985). No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) é responsável por regulamentar as enzimas permitidas para uso em alimentos, e através da Resolução da Diretoria Colegiada nº 53 de 07 de outubro de 2014 estabelece as fontes microbiológicas permitidas para produção de enzimas de uso industrial, que estão listadas no Quadro 2.1.

Quadro 2.1. Fontes de obtenção de β -galactosidase aprovadas pela ANVISA.

LEVEDURAS	<i>Kluyveromyces (Saccharomyces) lactis</i> <i>Kluyveromyces (Saccharomyces) fragilis</i> <i>Kluyveromyces marxianus</i> <i>Candida pseudotropicalis</i> <i>Saccharomyces sp</i>
BACTÉRIAS	<i>Bacillus licheniformis</i>
FUNGOS	<i>Aspergillus oryzae</i> <i>Aspergillus niger</i>

Fonte: Adaptado de BRASIL, 2014.

Variados estudos exploram diferentes fontes microbiológicas de β -galactosidase para imobilização de enzimas conforme descrito no Quadro 2.2

Capítulo 2 – Revisão Bibliográfica

Quadro 2.2. Diferentes fontes microbiológicas de β -galactosidase em estudos de imobilização de enzimas.

FONTE MICROBIOLÓGICA	TRABALHOS
<i>Aspergillus oryzae</i>	Guidini et al., 2010; Jovanovic-Malinovska et al., 2012; Mohy Eldin et al., 2012; Fischer et al., 2013; Wahba; Hassan, 2015; Falleiros et al., 2017; Bertoni et al., 2018.
<i>Kluyveromyces lactis</i>	Ansari et al., 2013; Satywali et al., 2013; Zhang et al., 2016; González-Cataño et al., 2017.
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Kokkiligadda et al., 2016.
<i>Aspergillus aculeatus</i>	Nguyen et al., 2018.
<i>Bacillus licheniformis</i>	Mair, 2010; Ayaz, Alnahdi e Danial, 2011
<i>Bacillus circulans</i>	Torres e Batista-Vieira, 2012; Benjamins et al., 2014; Escobar et al., 2016; Duarte et al., 2017.
<i>Escherichia coli</i>	Monier, 2013; Estevinho et al., 2014.
<i>Aspergillus alliaceus</i>	Sen, Lalitgauri e Chattopadhyay, 2012.

No geral, a β -galactosidase de bolores tem pH ótimo na faixa ácida (2,4 a 4,5), enquanto a β -galactosidase de leveduras e bactérias apresenta pH ótimo na região neutra (6,5 a 7,5). Este fato é de grande importância para os processos industriais, os quais podem escolher uma β -galactosidase de origem particular, dependendo das necessidades impostas pela natureza do substrato e produto. Desta forma, enquanto um pH de 3,5 a 4,0 é ideal para redução do conteúdo de lactose do soro ácido, uma enzima com pH ao redor de 7,0 é desejável para a redução do conteúdo de lactose do leite (SHUKLA, 1975).

Juajun et al. (2011) verificaram que as enzimas β -galactosidase obtidas a partir de bactérias do gênero *Bacillus licheniformis* têm pH de atividade ideal de 6,5 para hidrólise da lactose, condição ideal para aplicação em leite. De acordo com os trabalhos destes autores, essa enzima é estável na faixa de pH de 5 a 8, mantendo mais de 90% e 80% de sua atividade quando incubada a pH 6,5 e 37 °C durante 5 dias e 1 mês, respectivamente. A temperatura ideal da atividade da β -galactosidase foi de 50°C, e a melhor condição de armazenamento, por 1 mês, foi à temperatura de 37°C, condição em que a enzima manteve 90% da sua atividade inicial.

2.7. Imobilização de enzimas

O uso de enzimas em processos industriais tende a aumentar os custos de produção, pois na grande maioria, são catalisadores de alto custo. A recuperação e reutilização de enzimas através de biocatalisadores imobilizados torna o processo economicamente viável, por isso a imobilização enzimática se mostra promissora devido ao fato da possibilidade de reutilização do biocatalizador (RESENDE; SOCCOL; FRANÇA, 2016).

Imobilização é um termo genérico empregado para descrever a retenção de uma biomolécula no interior de um reator ou de um sistema analítico. No caso das enzimas, a imobilização consiste no confinamento da proteína em um suporte sólido insolúvel em meio aquoso e em solventes orgânicos, e pode ser usada isolada ou em combinação com outras técnicas de estabilização de proteínas, considerada uma das ferramentas mais eficientes para alterar a especificidade, seletividade, atividade e estabilidade das enzimas (MATEO et al., 2007).

O primeiro trabalho sobre imobilização de enzima foi em 1916, quando Nelson e Griffin adsorveram invertase em carvão ativado e alumina, com retenção de atividade na inversão de sacarose, embora o objetivo destes pesquisadores fosse a purificação da enzima.

Apesar do alto custo, os sistemas em que ocorre a imobilização da enzima são mais viáveis economicamente do que os sistemas em que permanecem solúveis, pois os processos em que são mantidas imobilizadas podem ser executados continuamente e oferecem a possibilidade de reutilização das mesmas (SZCZODRAK, 2000).

Ayaz, Alnahdi e Danial (2011) imobilizaram β -galactosidase de *Bacillus licheniformis* em contas de alginato e verificaram aumento no range das condições ótimas de temperatura e pH da enzima imobilizada em relação à enzima na forma livre, isto é, enquanto a enzima livre possui condições ótimas de temperatura à 50 °C e pH 6,0, a enzima imobilizada é estável à

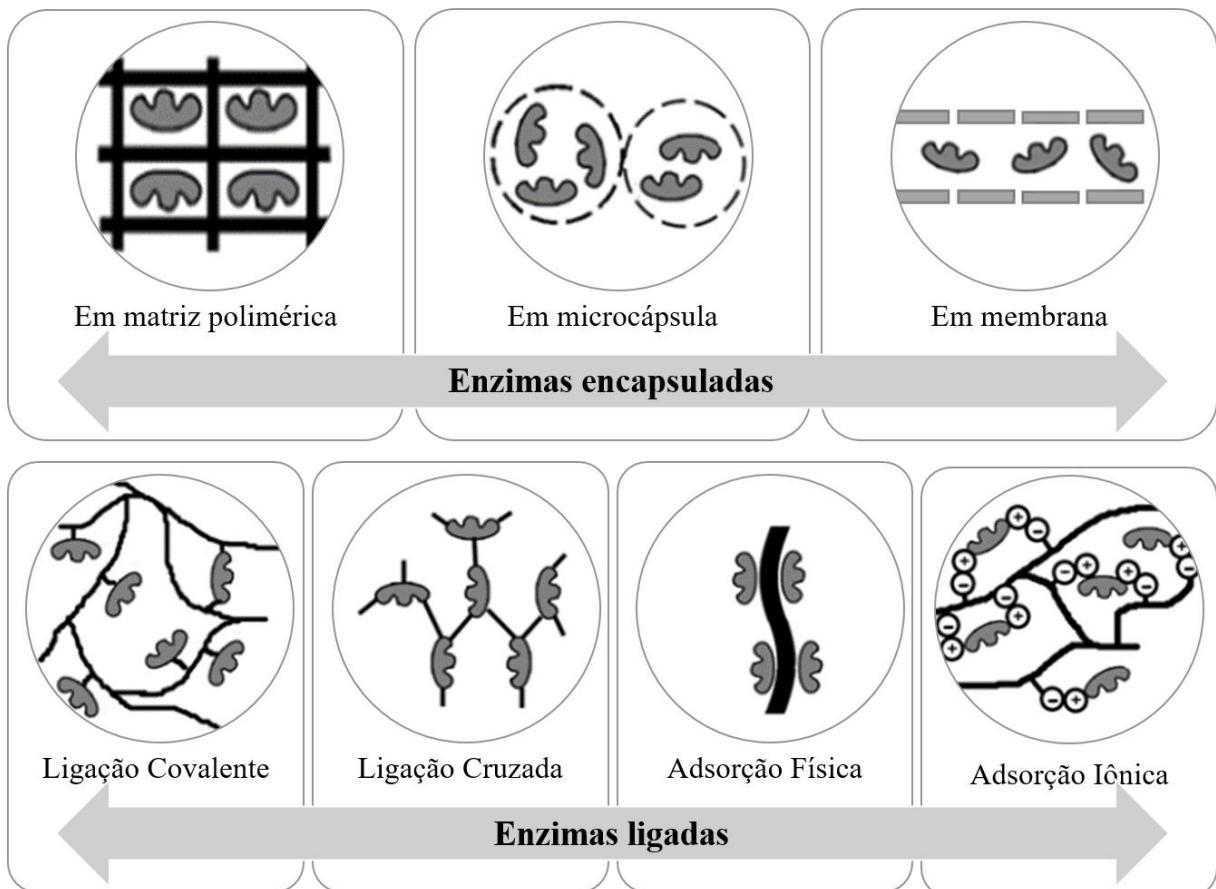
Capítulo 2 – Revisão Bibliográfica

temperatura de 40 °C a 60 °C e pH de 5,0 a 8,0. Essa melhora nas condições ótimas permite que a enzima imobilizada seja utilizada em diferentes situações de hidrólise.

2.8. Tipos de imobilização

Alguns métodos são amplamente descritos na literatura e utilizados para minimizar os possíveis problemas de instabilidade da enzima, em determinadas reações, buscando melhorar sua atuação em diversas aplicações. De uma forma geral pode-se agrupar os métodos de imobilização em encapsulação e por ligação (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004; MENDES et al., 2011). Na Figura 2.3 está apresentado um esquema dos principais métodos de imobilização de enzimas.

Figura 2.3. Principais métodos de imobilização de enzimas



Fonte: Adaptado de CARDOSO; MORAES; CASS, 2009.

2.8.1. Imobilização por encapsulação

Nesse método vai ocorrer o aprisionamento da enzima dentro de uma rede polimérica através de ligações covalentes ou não covalentes que permitem a passagem de substrato e produto, mas retêm a enzima. Nesse método a enzima não se encontra ligada na matriz ou suporte, o que diferencia de outros métodos. Existem diversos métodos de aprisionamento de enzimas como o aprisionamento em fibras, em gel, microencapsulação (SIRISHA; JAIN; JAIN, 2016).

As principais vantagens da utilização deste método de imobilização é a grande área superficial disponível para o contato do sítio ativo da enzima com o substrato e da possibilidade de realizar a imobilização de diferentes enzimas num mesmo suporte, ao mesmo tempo (MENDES et al., 2011). Um exemplo de imobilização de enzimas por retenção física é a microencapsulação, que é caracterizada pelo revestimento (ou aprisionamento) da enzima com um polímero formando microesferas (RATHORE et al., 2013).

Bertoni et al. (2018) encapsularam β -galactosidase em micropartículas lipídicas sólidas (MLS) utilizando *spray cooling* com objetivo de produzir uma enzima que suporte o trato digestivo e tenha sua forma ativa no intestino delgado. O congelamento por pulverização possibilitou a preparação de um sistema viável, não tóxico e barato caracterizado por micropartículas esféricas com valores de eficiência de encapsulação superiores a 95%. Também foi verificado no mesmo trabalho que a atividade e os parâmetros cinéticos da enzima não foram afetados pelo encapsulamento em MSL, demonstrando que a tecnologia proposta não causou perda ou degradação da β -galactosidase durante o processo de preparação.

No trabalho de Zhang et al. (2016) a encapsulação da enzima β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* foi através do método de gelificação por injeção: uma solução de β -galactosidase e κ -carragenina foi injetada em uma solução de endurecimento contendo íons de potássio formando contas esféricas e lisas com diâmetros variando de cerca de 2 a 3 mm. Estudos da atividade catalítica indicaram que a encapsulação da enzima nas esferas de hidrogel poderia aumentar a atividade da β -galactosidase sob condições moderadas de pH e temperatura. Uma das principais limitações deste estudo foi o fato de, em solução aquosa, a esferas não serem capazes de reter a enzima dentro da microcápsula.

2.8.2. Imobilização por adsorção física e por ligação iônica

A imobilização através de adsorção física ocorre por meio de interações fracas envolvendo ligações de hidrogênio, van der Waals, ou interações hidrofóbicas entre a enzima e o suporte, sem que haja a necessidade de modificação (ou funcionalização) do suporte. Este tipo de imobilização é o mais benéfico para a enzima em relação à preservação do sítio ativo, causando pouca ou nenhuma alteração na estrutura e mantendo a atividade catalítica. Além do mais, caso a enzima seja irreversivelmente desativada, é possível recuperar o suporte para uma posterior reutilização a partir da dessorção da enzima inativa (JESIONOWSKI; ZDARTA; KRAJEWSKA, 2014).

A eficiência deste método está diretamente ligada às variáveis do processo tais como pH, força iônica do meio e a relação entre a concentração da enzima e o suporte. Por isso, é necessário um certo cuidado com o derivado imobilizado por adsorção, para que as condições ótimas de imobilização sejam preservadas e o sistema se mantenha sem alterações significativas (MESSING, 1975).

O princípio envolvido no método de imobilização por ligação iônica baseia-se na atração da enzima pelo suporte sólido, que contém resíduos para troca iônica. A principal diferença entre a adsorção física e a ligação iônica é a energia envolvida entre a enzima e o suporte, pois as ligações iônicas são mais fortes do que as forças de Van der Waals e ligações de hidrogênio, porém mais fracas do que a ligação covalente, nesses sistemas (ROCHA et al., 2006).

A imobilização por ligação iônica envolve interações iônicas e eletrostáticas entre íons de proteínas e íons de carga oposta da resina e é um procedimento afetado por fatores como concentração da enzima, temperatura, pH e força iônica do meio de imobilização. A natureza das resinas de troca iônica é complexa e a grande maioria delas é constituída por polímeros. Baseado nisso, Guidini et al. (2010) estudaram o processo de imobilização da β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* utilizando a resina de troca iônica Duolite A568 como suporte e obtiveram resultados indicando que a retenção da atividade enzimática durante o processo de imobilização foi fortemente dependente das variáveis pH e concentração da enzima, sendo maximizada em pH 4,5 e concentração enzimática de 16 g.L⁻¹.

Embora a aplicabilidade das enzimas adsorvidas não seja tão ampla quanto a das enzimas ligadas covalentemente, Satyawali et al. (2013) utilizaram óxidos metálicos (OM) como suporte de imobilização devido à sua estabilidade térmica e química e à presença de vários grupos funcionais de superfície, além de ser um método de imobilização simples. Neste

Capítulo 2 – Revisão Bibliográfica

trabalho, um total de 13 OMs com tamanhos variando de 0,01 μm a 5 μm foram testados quanto ao seu desempenho como suporte para imobilização de β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis*, sendo a alumina, α -Al₂O₃ C e γ -Al₂O₃, o OM com melhor performance, obtendo uma atividade da enzima imobilizada de 288 e 266 U.g⁻¹ MO respectivamente.

2.8.3. Imobilização por ligação covalente

A imobilização enzimática pelo método de ligação covalente é um dos métodos mais utilizados e estudados (MOHAMAD et al., 2015). Neste método ocorre os mais variados tipos de ligações, podendo imobilizar a enzima através de qualquer um dos seus grupos reativos. Este tipo de ligação ocorre entre o grupo reativo do suporte e, principalmente, com os aminoácidos (lisina, cisteína, tirosina e histidina) da enzima, sendo que os aminoácidos de caráter hidrofóbico, por não estarem expostos na superfície proteica, são descartados neste tipo de ligação (ALFAYA; KUBOTA, 2002).

De acordo com Tran e Balkus (2012), o emprego de ligações covalentes entre enzimas e suportes sólidos é a forma mais efetiva de prevenir sua dessorção. Por outro lado, a imobilização por ligações covalentes tem a desvantagem de que, caso a enzima perca sua atividade, ambos, enzima e suporte, não poderão ser reutilizados em um novo processo de imobilização (SHELDON; VAN PELT, 2013).

A combinação de suportes simples e condições que favorecem ligações covalentes é amplamente estudada. Ao investigar a imobilização de β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* em nanopartículas de dióxido de silício ativada com glutaraldeído, Verma et al. (2012) observaram, através da cinética da enzima livre e imobilizada, que a β -galactosidase sofreu uma alteração conformacional durante a imobilização, resultando em uma mudança no pH e temperatura da reação bem como nas constantes cinéticas. Também foi relatado pelos que autores que devido à boa relação custo-benefício, excelente estabilidade e capacidade de reutilização, a enzima imobilizada em dióxido de silício pode ser aplicada na conversão de soro de leite em produtos de valor agregado.

No trabalho de Eskandarloo e Abbaspourrad (2018) além de utilizarem glutaraldeído para melhorar a capacidade de formação das ligações covalente, as esferas de vidro utilizadas como suporte enzimático foram tratadas anteriormente com 3-aminopropiltrióxilosilano (3-APTES) para ativar os grupos silanol na superfície. A enzima β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* imobilizada em esferas de vidro foram empacotadas em reator e utilizadas para converter continuamente permeado de soro em galacto-oligossacarídeos e observou-se um aumento do

pH ótimo e da estabilidade térmica para a enzima imobilizada em relação à enzima livre, com uma atividade máxima em pH 5,2 e temperatura de 60 °C.

2.9. Suportes para imobilização

Segundo Miletic, Nastasovic e Loos (2012), as características do suporte são fundamentais no processo de imobilização enzimática. Suas características físicas irão determinar o tipo de sistema mais adequado ao processo de imobilização (tanque em agitação, fluidização, leito fixo, etc.). Embora não exista um suporte universal, certas características devem ser consideradas em sua escolha:

1. Estabilidade frente aos parâmetros de processo e ataque microbiano;
2. Funcionalidade química;
3. Durabilidade e capacidade de reutilização;
4. Elevada área superficial e alta porosidade;
5. Compatibilidade aceitável com a enzima e substrato;
6. Tamanho e forma adequados;
7. Custo;
8. Facilidade de manuseio.

Na literatura, são citados vários materiais que podem ser utilizados como suporte para imobilização de β -galactosidase como a quitosana (ELNASHAR; YASSIN, 2009; DUARTE et al., 2017; URRUTIA et al., 2018; RICARDI et al., 2018), resina Duolite A568 (GUIDINI et al., 2010; GÜRDAS; GÜLEÇ; MUTLU, 2012; FISCHER et al., 2013; FALLEIROS et al., 2017); esferas de vidro (ESKANDARLOO; ABBASPOURRAD, 2018), resina macroporosa Purolite ®A-109 (MIHAILOVIĆ et al., 2014; CAREVIĆ et al., 2016), polímero Eupergit® C (BRAGA et al., 2014; BENJAMINS et al., 2014) e agarose (RODRÍGUEZ-COLINAS et al., 2016; GUERRERO et al., 2017). Eles podem ser de origem orgânica ou inorgânica, sintéticos ou naturais, e algumas vezes é necessário que estes suportes tenham uma modificação ou inclusão de grupos reativos, para a ativação do mesmo, como no caso dos géis de gioxil-agarose, divinilsulfona-agarose, gioxilamino-agarose, entre outros (MENDES; DE CASTRO; GIORDANO, 2013; SILVA et al., 2014; ALBUQUERQUE et al., 2016).

Os suportes inorgânicos apresentam melhores características para aplicações em processos industriais devido à sua boa resistência às ações físicas, químicas, térmicas e microbianas, além da resistência mecânica e estabilidade industrial, que evita a compactação

Capítulo 2 – Revisão Bibliográfica

em processos contínuos e a possibilidade de regeneração do suporte (CABRAL; NOVAIS; CARDOSO, 1981; COUTINHO FILHO; RIBEIRO; MAUGERI FILHO, 2005; MESSING, 1978; RIBEIRO, 1989). Os suportes orgânicos apresentam uma diversidade de radicais disponíveis para a ligação com as enzimas, enquanto os inorgânicos possuem um caráter inerte (KENNEDY; CABRAL, 1987).

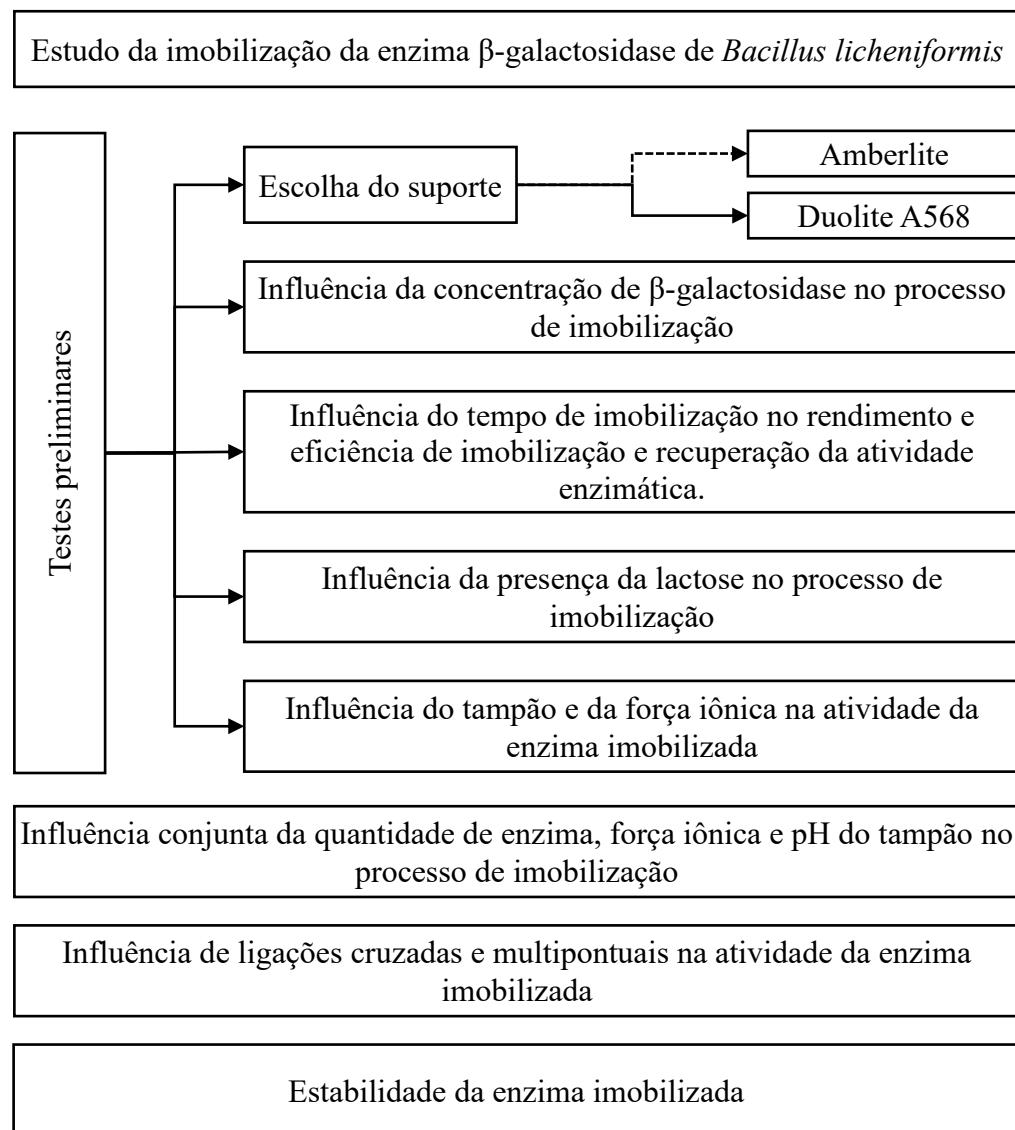
A Duolite A568 é uma resina de troca iônica fracamente básica que liga a enzima através de uma combinação da ligação eletrostática entre os grupos de amina terciária da resina e os grupos de ácido carboxílico da enzima e a simples ligação de adsorção formada com ligações de hidrogênio e forças de van der Waals (GÜRDAS; GÜLEÇ; MUTLU, 2012; FISCHER et al., 2013). Estudos demonstraram o potencial de reutilização da isomerase-D-hexone imobilizada em Duolite A568 na produção contínua de manose a partir de frutose (PARK et al., 2010) e boa estabilidade térmica quando exonuclease foi imobilizada em Duolite A-568 combinado com glutaraldeído (SINGH; DHALIWAL; PURI, 2007).

Este suporte já foi estudado na imobilização de diferentes enzimas, Cabral et al. (2017) imobilizaram invertase em Duolite A568 através do processo de adsorção e reticulação com glutaraldeído e obtiveram um biocatalisador imobilizado com maior estabilidade térmica em baixas temperaturas, enquanto Kim et al. (2017) compararam nove suportes hidrofílicos e hidrofóbicos para imobilização de lipase e verificaram a Duolite A568 como o melhor suporte dentre eles.

CAPÍTULO 3 – MATERIAL E MÉTODOS

Neste Capítulo serão apresentados o material e os métodos utilizados para imobilização da enzima β -galactosidase de *Bacillus licheniformis*. Na Figura 3.1 estão apresentadas as etapas do trabalho.

Figura 3.1. Fluxograma ilustrativo das etapas do trabalho



3.1. Material

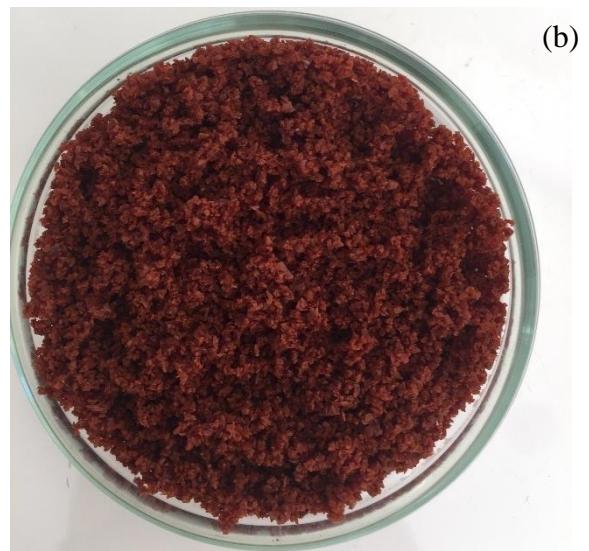
3.1.1. Enzima

Neste trabalho foi utilizada a enzima β -galactosidase produzida pelo microrganismo *Bacillus licheniformis* na forma líquida. Essa enzima é da marca Novozymes (Bagsværd, Dinamarca) e foi gentilmente cedida pela empresa Granolab/ Granotec Nutrição e Biotecnologia (Araucária, Brasil). De acordo com as definições do fabricante as condições ótimas para a enzima na forma livre são faixa de pH entre 4,2 e 9,0 e temperatura entre 2 e 50°C. A atividade da enzima na forma livre quando em solução de 43 mL.L⁻¹ foi de 953 U [micromol de glicose produzida por minuto ($\mu\text{mol}.\text{min}^{-1}$)].

3.1.2. Suporte para imobilização

Foram testadas duas resinas de troca iônica, Duolite A568 e Amberlite XAD761 (Figura 3.2), como suporte para imobilização. Ambas foram cedidas gentilmente pela Dow Chemical Company (Califórnia, Estados Unidos).

Figura 3.2.(a) Resinas Duolite A568 e (b) Amberlite XAD761 utilizadas para imobilização da enzima β -galactosidase



Fonte: Arquivo pessoal

Essas resinas são trocadores aniónicos fracamente básicos, baseados em ligação cruzada de fenol-formaldeído, usados como suporte (orgânico sintético) de enzimas em aplicações de bioprocessos, cujas principais características indicadas pelo fabricante são apresentadas na Tabela 3.1.

Tabela 3.1. Características das resinas

	Duolite A568	Amberlite XAD761
Matrix	Fenol-formaldeído	Fenol-formaldeído
Grupo funcional	Amina Terciária	Fenol principal
Forma física	Grânulos de cor verde a cinza	Grânulos de cor ocre
Temperatura máxima	65°C	40°C
Faixa de pH	Não especificado	Acima de 8,0
Tamanho do poro	15 a 25 nm	560.000 a 760.000 nm
Porosidade	0,78 – 1,0 mL.g ⁻¹	0,95 – 1,18 mL.g ⁻¹
Densidade	307 g.L ⁻¹	615 g.L ⁻¹

Fonte: Rohm Haas, 2004 e Dow.

3.1.3. Unidade experimental

A unidade experimental foi montada no Laboratório de Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Uberlândia *campus* Patos de Minas, onde foram realizados os experimentos com a enzima na forma livre e imobilizada.

O reator de mistura tipo cesta utilizado, apresentado na Figura 3.3, consistiu em um reator de mistura de volume útil de 250 mL, dotado de uma camisa externa para circulação de água proveniente de banho termostatizado (Solab, Piracicaba, Brasil) para controle de temperatura, submetido à agitação magnética. As partículas de enzima imobilizada foram colocadas dentro de uma cesta de aço inox de 100 mesh, e esta, colocada dentro do reator evitando o atrito entre o agitador e a enzima imobilizada.

Figura 3.3. Unidade experimental com reator tipo cesta



Fonte: Arquivo Pessoal

3.1.4. Preparação do substrato

A solução de lactose com concentração de 50 g.L^{-1} , utilizada como substrato, foi preparada em solução tampão lático pH 6,5 com a lactose micronizada da empresa Alibra (Marechal Cândido Rondon, Brasil), fornecida gentilmente pela empresa Cemil (Patos de Minas, Brasil).

3.2. Método analítico

A atividade das enzimas na forma livre, immobilizada e do sobrenadante da immobilização foi determinada através do método das taxas iniciais que determina a quantidade de glicose formada por minuto.

A reação de hidrólise para determinação da atividade ocorreu a 40°C , com um volume de 75 mL de substrato, com concentração de lactose de 50 g.L^{-1} , adaptado de Guidini et al. (2010) e Falleiros et al. (2017). Para cada experimento foram tomadas cinco amostras do meio reacional em intervalos de tempo de 3 minutos, totalizando 15 minutos de reação. Cada amostra foi colocada em um tubo de ensaio, o qual foi tampado e imediatamente colocado em um banho de água à 80°C , por 10 minutos para inativar qualquer atividade enzimática. A quantificação da glicose foi realizada pelo método enzimático glicose-oxidase enzimático-colorimétrico Bioliquid® (Laborclin, Pinhais, Brasil), com leitura no comprimento de onda de 505 nm em

Capítulo 3 – Material e Métodos

espectrofotômetro. As leituras foram realizadas em triplicata para uma maior confiabilidade nos resultados obtidos.

Para o cálculo da concentração de glicose formada foi utilizada a Equação 3.1, recomendado pelo fabricante:

$$Glicose = \frac{Absorbância\ teste}{Absorbância\ padrão} \times 100\ mg.dL^{-1} \quad (3.1)$$

A unidade de atividade enzimática U foi definida como micromol de glicose produzida por minuto ($\mu\text{mol}.\text{min}^{-1}$). Para o cálculo da atividade enzimática (seja na forma livre ou imobilizada) foi seguida a equação 3.2:

$$AE = \frac{GFM}{0,18} \times V \quad (3.2)$$

Onde: AE = atividade enzimática ($\mu\text{mol}.\text{min}^{-1}$)

GFM = glicose formada por minuto ($\text{mg}.\text{mL}^{-1}.\text{min}^{-1}$)

0,18 = Massa molar da glicose ($\text{mg}.\mu\text{mol}^{-1}$)

V = volume total do reator (mL)

3.3. Métodos experimentais

3.3.1. Pré-tratamento das resinas

O pré-tratamento da resina Amberlite XAD761 foi realizado em erlenmeyer, sob agitação, de acordo com a metodologia utilizada por Oliveira (2013), em que foram seguidos os seguintes passos: primeiramente foram realizadas três lavagens sucessivas da resina com solução de metanol 50%, na proporção 3:1 de volume solvente/volume de resina, em seguida foram feitas três lavagens sucessivas com água destilada, também na proporção 3:1 volume água/volume de resina e por fim foram realizadas mais três lavagens sucessivas com etanol, na mesma proporção solvente/resina das lavagens anteriores. Cada lavagem teve duração de 30 minutos. Ao final, a resina foi lavada exaustivamente totalizando 10 vezes, para remoção do etanol utilizando água destilada na proporção 10:1 (água:resina), com duração de 10 minutos para cada lavagem.

Capítulo 3 – Material e Métodos

A resina Duolite A568 foi ativada de acordo com a metodologia do fabricante: ácido clorídrico 1 M, na razão de dez volumes de solução por volume de resina, durante 30 minutos em incubadora rotativa a 50 rpm. A seguir foi adicionado hidróxido de sódio 1 M, nas mesmas condições e procedimentos realizados para o tratamento ácido. A resina foi lavada com água destilada entre os tratamentos. No final do processo a resina foi lavada com água destilada, filtrada à vácuo e seca à temperatura ambiente (aproximadamente 25°C).

3.3.2. Processo de imobilização

O processo de imobilização foi realizado utilizando uma massa de 0,5 g de resina, pré-tratada, incubada em 10 mL de solução enzimática sob agitação de 150 rpm em mesa rotativa com temperatura ambiente (aproximadamente 25°C), salvo condições definidas em cada experimento.

3.3.3. Escolha do suporte

Os testes preliminares para escolha do suporte foram realizados através processo de imobilização da enzima nas resinas de troca iônica Amberlite XAD761 e Duolite A568. A resina Aberlite XAD761 foi testada em 3 diferentes soluções tampão, sendo: tampão fostato 100 mM pH ajustado para 9,0 com uso de hidróxido de sódio, adaptado de Farag, Afifi e Abd-Rabow, (2011), tampão Britton-Robinson 40 mM pH 8,5 adaptado de Fernandéz e Martin, (1977) e tampão acetato 200 mM pH 4,5. Para a imobilização em Duolite A568 foi utilizada apenas o tampão acetato 200 mM pH 4,5 conforme descrito por Guidini et al. (2010). Em todas as situações, a concentração enzimática da solução de imobilização foi de 15 mL.L⁻¹ e o tempo de imobilização foi de 1 hora.

3.3.4. Influência da concentração de β -galactosidase na atividade da enzima imobilizada.

Após os resultados dos testes preliminares com os suportes para imobilização de β -galactosidase descritos no item 3.3.3, a resina Duolite A568 foi escolhida como o suporte para a sequência do trabalho.

Para o estudo da influência da concentração de β -galactosidase na atividade da enzima imobilizada, foram realizadas reações de imobilização com concentrações de enzima que

Capítulo 3 – Material e Métodos

variaram de 7 mL.L⁻¹ a 58 mL.L⁻¹. A solução de imobilização consistiu em tampão acetato 200 mM, pH 4,5 e o tempo de imobilização de 2 horas. Após o processo de imobilização a massa de resina foi lavada com tampão lático por 5 vezes e utilizada para determinação da atividade enzimática pelo método das taxas iniciais de reação, conforme descrito no item 3.2.

3.3.5. Influência do tempo na atividade da enzima imobilizada.

Após análise dos resultados dos testes preliminares descritos no item 3.3.4, fixou-se a concentração da enzima β -galactosidase em 43 mL.L⁻¹ para os próximos testes preliminares.

Para o estudo da influência do tempo de imobilização na atividade da enzima imobilizada, variou-se o tempo em 1,5 a 12 horas de imobilização. Concomitantemente, preparou-se 10 mL da solução enzimática com concentração de 43 mL.L⁻¹, nas mesmas condições experimentais da imobilização, porém na ausência de suporte, para determinação da atividade da enzima livre.

Após o processo de imobilização a solução residual da imobilização foi reservada para a quantificação da atividade do sobrenadante e a massa de resina (biocatalisador imobilizado) foi lavada 5 vezes com tampão lático. Foram utilizados 5 mL da solução de enzima livre, do sobrenadante e toda a massa da resina filtrada para determinação da atividade enzimática pelo método das taxas iniciais de reação, conforme descrito no item 3.2.

De acordo com o descrito por Sheldon e Van Pelt (2013), os termos comumente utilizados para determinar o êxito do processo de imobilização são: rendimento da imobilização, eficiência da imobilização e a recuperação da atividade enzimática. O rendimento da imobilização é utilizado para caracterizar a porcentagem de atividade da enzima livre que é de fato imobilizada e pode ser representada pela equação (3.3) (SHELDON; VAN PELT, 2013).

$$\text{Rendimento de imobilização} = 100 \times \frac{\text{Atividade imobilizada}}{\text{Atividade inicial}} \quad (3.3)$$

A atividade imobilizada pode ser deduzida através da diferença entre a atividade inicial e a atividade do sobrenadante após a imobilização, este valor não está relacionado com a atividade da enzima imobilizada. O termo eficiência da imobilização está relacionado com a porcentagem da atividade enzimática observada no imobilizado em relação à atividade imobilizada, conforme a equação (3.4) (SHELDON; VAN PELT, 2013).

$$Eficiência\ de\ imobilização = 100 \times \frac{Atividade\ observada}{Atividade\ imobilizada} \quad (3.4)$$

Para obter o termo que descreve a recuperação da atividade multiplica-se o rendimento da imobilização pela eficiência da imobilização, seguindo a equação (3.5) (SHELDON; VAN PELT, 2013). Este resultado representa qual o percentual da atividade enzimática inicial foi imobilizada na forma ativa.

$$Recuperação\ da\ atividade = 100 \times \frac{Atividade\ observada}{Atividade\ inicial} \quad (3.5)$$

Para determinação do rendimento de imobilização, eficiência de imobilização e recuperação da atividade foram utilizadas as atividades da enzima na forma livre, na forma imobilizada e do sobrenadante e aplicadas às equações (3.3), (3.4) e (3.5) das seguintes formas:

$$\text{Atividade observada} = \text{Atividade da enzima imobilizada}$$

$$\text{Atividade imobilizada} = \text{Atividade da enzima livre} - \text{Atividade do sobrenadante}$$

$$\text{Atividade inicial} = \text{Atividade da enzima livre}$$

Após análise dos resultados dos testes preliminares para o tempo de imobilização, foram realizados ensaios comparando os tempos de imobilização de 2 e 6 horas para avaliar se há diferença significativa na atividade da enzima imobilizada quando comparados estes tempos de imobilização. Os resultados foram avaliados através de Análise de Variância (ANOVA).

3.3.6. Influência da presença da lactose na atividade da enzima imobilizada

Ao analisar dos resultados dos testes preliminares descritos no item 3.3.5, fixou-se o tempo de imobilização em 2 horas para as próximas etapas deste trabalho.

Para o estudo da influência da presença do substrato no processo de imobilização foram utilizadas duas condições de solução de imobilização, na primeira, a imobilização ocorreu na ausência de substrato, e na segunda, na presença de 0,5 g de lactose, que corresponde à concentração de 50 g.L⁻¹.

Após análise dos resultados, repetiu-se a imobilização da enzima nas condições experimentais descritas acima, porém com temperatura de 10°C para avaliar a interferência da temperatura quando o processo de imobilização ocorre na presença de substrato.

Ao final do processo de imobilização, a massa de resina foi filtrada, lavada com tampão lático por 5 vezes e utilizada para determinação da atividade enzimática pelo método das taxas iniciais de reação, conforme descrito no item 3.2.

3.3.7. Influência do tampão e da força iônica na atividade da enzima imobilizada

Foram realizados experimentos com dois tampões diferentes para avaliar a influência do tampão e da força iônica na atividade da enzima imobilizada. As soluções de imobilização foram preparadas nos tampões Acetato e Britton-Robinson (BR), adaptado de Fernández e Martin, (1977), ambos com pH 4,5 e forças iônicas de 40 mM e 200 mM.

Ao final do processo de imobilização conforme descrito no item 3.3.2, a massa de resina foi filtrada, lavada com tampão lático por 5 vezes e utilizada para determinação da atividade enzimática pelo método das taxas iniciais de reação, conforme descrito no item 3.2.

3.3.8. Influência conjunta da concentração da enzima, força iônica e pH da solução de imobilização na atividade da enzima imobilizada

Ao analisar os resultados dos experimentos realizados no item 3.3.7, definiu-se o tampão BR para os próximos passos deste trabalho.

Foi proposto um Planejamento Composto Central Rotacional para analisar o processo de imobilização da enzima β -galactosidase com objetivo de encontrar as melhores condições de processo nestas faixas estudadas. As variáveis estudadas foram concentração da enzima, força iônica e pH da solução de imobilização com três réplicas centrais totalizando 17 experimentos e α igual a 1,68179. Os valores reais e codificados das variáveis do planejamento estão apresentados na Tabela 3.2.

Tabela 3.2. Matriz do Planejamento Composto Central Rotacional do efeito da concentração da enzima, força iônica e pH da solução de imobilização.

Experimento	Valor Real (Valor Codificado)		
	Concentração da enzima (mL.L ⁻¹)	Força Iônica (mM)	pH
1	28 (-1)	60 (-1)	4,0 (-1)
2	43 (1)	60 (-1)	4,0 (-1)
3	28 (-1)	170 (1)	4,0 (-1)
4	43 (1)	170 (1)	4,0 (-1)
5	28 (-1)	60 (-1)	9,0 (1)
6	43 (1)	60 (-1)	9,0 (1)
7	28 (-1)	170 (1)	9,0 (1)
8	43 (1)	170 (1)	9,0 (1)
9	23 (-α)	120 (0)	6,5 (0)
10	48 (α)	120 (0)	6,5 (0)
11	35,5 (0)	20 (-α)	6,5 (0)
12	35,5 (0)	210 (α)	6,5 (0)
13	35,5 (0)	120 (0)	2,3 (-α)
14	35,5 (0)	120 (0)	10,7 (α)
15	35,5 (0)	120 (0)	6,5 (0)
16	35,5 (0)	120 (0)	6,5 (0)
17	35,5 (0)	120 (0)	6,5 (0)

O processo de imobilização ocorreu conforme descrito no item 3.3.2 e tempo de imobilização de 2 horas conforme definido no item 3.3.6. Ao final do tempo de imobilização, a massa de resina foi filtrada e lavada com tampão lático por 5 vezes e utilizada para determinação da atividade enzimática pelo método das taxas iniciais da reação, conforme descrito no item 3.2.

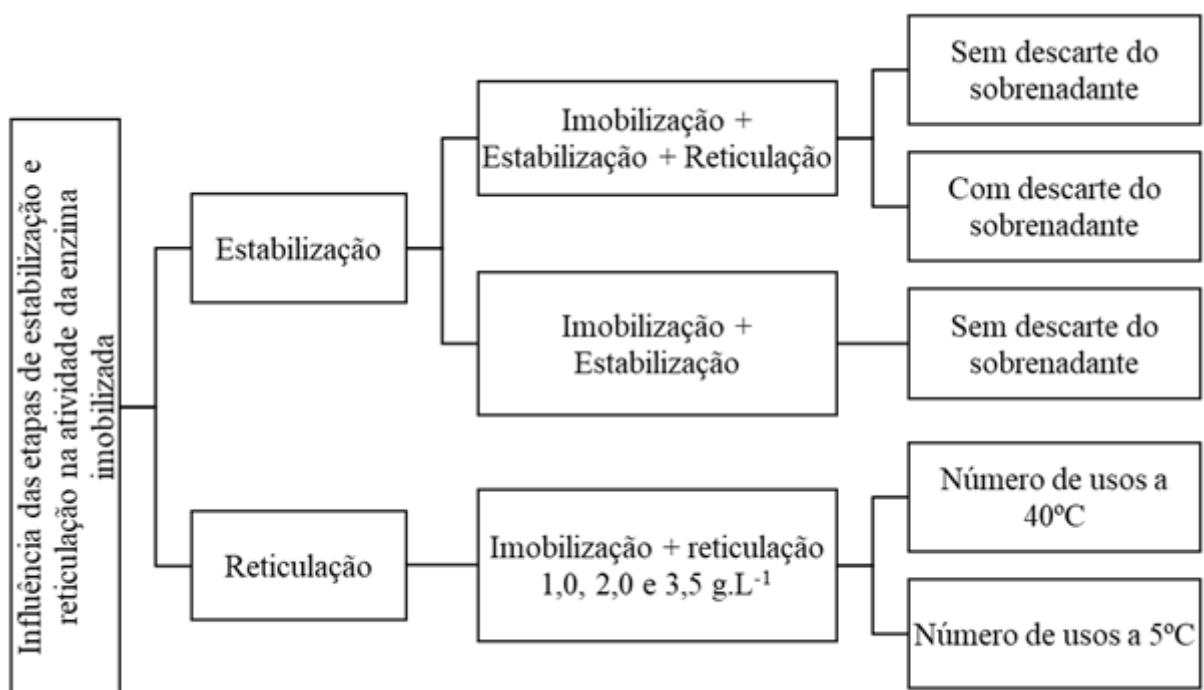
Como resposta a esse planejamento, a variável dependente foi a atividade da enzima imobilizada. Os resultados foram analisados por meio do software *Statistica®* 12.0.

3.3.9. Influência de ligações cruzadas e multipontuais na atividade da enzima immobilizada

Após análises dos resultados do Planejamento Composto Central Rotacional, definiu-se a condição ótima de immobilização como solução de immobilização com concentração enzimática de 43 mL.L⁻¹ e tampão BR com pH 4,0 e força iônica 40 mM.

Estudou-se a influência das etapas adicionais de estabilização e reticulação na atividade da enzima immobilizada com objetivo de favorecer a formação de ligações cruzadas e multipontuais entre a enzima e o suporte e consequentemente melhorar a estabilidade da enzima immobilizada. A Figura 3.4 ilustra as etapas dos testes preliminares para avaliação da influência das ligações cruzada e multipontuais na atividade da enzima immobilizada.

Figura 3.4. Testes preliminares para influência das ligações cruzadas e multipontuais na atividade da enzima immobilizada



O processo de ligações multipontuais, definido como estabilização neste trabalho, consistiu em incubar a enzima immobilizada em 10 mL de solução fosfato 100 mM pH 9,0 e manter o sistema sob agitação de 150 rpm em mesa rotativa à temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C) por 24 horas (MATEO et al., 2000; LETCA et al., 2004; FALLEIROS et al., 2017).

Capítulo 3 – Material e Métodos

O processo de ligação cruzada foi realizado com glutaraldeído como agente reticulante. Uma massa de 0,5 g de enzima immobilizada foi submersa em 5 mL de solução de glutaraldeído (proporção 1:10) e submetida à agitação de 150 rpm por 1,5 horas em temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C). Nesta etapa foram estudadas as concentrações de glutaraldeído de 1,0 g.L⁻¹, 2,0 g.L⁻¹ e 3,5 g.L⁻¹. As condições de tempo e concentração de glutaraldeído foram definidas baseando-se nos resultados obtidos por Guidini et al. (2010) e Sousa (2018).

Para o procedimento em que a immobilização foi seguida da estabilização e reticulação com descarte do sobrenadante, entre cada etapa para obtenção do biocatalizador immobilizado, descartou-se a fase líquida e adicionou-se a solução da etapa seguinte sem enxágue da fase sólida (suporte + enzima immobilizada). Nos procedimentos sem descarte do sobrenadante, as soluções foram sobrepostas umas às outras.

Ao final dos processos de immobilização, estabilização e reticulação, conforme cada experimento, a massa de resina foi filtrada, lavada com tampão lático por 5 vezes e utilizada para determinação da atividade enzimática pelo método das taxas iniciais de reação, conforme descrito no item 3.2.

3.3.10. Estabilidade da enzima immobilizada

Neste estudo avaliou-se a interferência da concentração do glutaraldeído na estabilidade da enzima immobilizada através de sucessivos usos da enzima immobilizada em meio sintético com lactose.

Previvamente, os testes foram conduzidos à temperatura de 40°C e o tempo de hidrólise foi de 15 minutos, o mesmo tempo utilizado para determinar a atividade enzimática. Esta etapa foi realizada para delinear qual concentração de glutaraldeído apresentaria uma adequada estabilidade combinada com uma conveniente atividade enzimática inicial.

Posteriormente, foram estabelecidas duas concentrações de glutaraldeído (1,0 g.L⁻¹ e 3,5 g.L⁻¹) para comparar com a estabilidade da enzima que foi submetida apenas à etapa de immobilização. Nesta etapa a temperatura de hidrólise ocorreu à 5°C, similar à temperatura utilizada pelas indústrias de laticínios na produção de leite hidrolisado, e o tempo de reação foi determinado à medida que toda a hidrólise da lactose da solução ocorresse. A atividade enzimática foi determinada através das taxas iniciais de cada utilização conforme item 3.2.

Adicionalmente foi investigada a estabilidade da enzima immobilizada ao armazenamento por 36 dias à 4°C em solução tampão BR 40 mM e pH 4,0.

CAPÍTULO 4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo serão apresentados e discutidos os principais resultados obtidos no desenvolvimento deste trabalho. Preliminarmente serão apresentados os resultados para os testes iniciais de escolha do suporte, concentração da enzima, tempo de imobilização, presença do substrato na solução de imobilização e tampão e força iônica do tampão. Na sequência serão apresentados os resultados para o Planejamento Composto Central Rotacional que estudou a influência da concentração da enzima, força iônica e pH da solução de imobilização na atividade da enzima imobilizada e o estudo da influência da concentração de Glutaraldeído na atividade da enzima imobilizada. Por fim, serão apresentados os resultados dos testes de estabilidade da enzima imobilização em relação ao armazenamento e ao número de usos.

4.1. Escolha do suporte

Os resultados experimentais de atividade enzimática para imobilização em Amberlite XAD761 estão apresentados na Tabela 4.1. Em todos experimentos foi observada atividade enzimática no suporte após a imobilização.

Tabela 4.1. Atividade enzimática (U) da enzima imobilizada em Amberlite XAD761

Tampão	Acetato	Fosfato	Britton-Robinson
	200 mM pH 4,5	100 mM pH 9,0	300 mM pH 8,5
Atividade	15	112	147

Como observado, a retenção de β -galactosidase em Amberlite XAD761 apresentou influência do tampão e pH utilizados no processo de imobilização, sendo o tratamento com tampão Britton-Robinson 300 mM e pH 8,5 o que apresentou melhor atividade nesta resina, com 147 U. Este resultado pode estar relacionado com as características da resina apresentadas na Tabela 3.1 que indicaram uma faixa de pH acima de 8,0, o que justifica também uma baixa retenção de enzima quando imobilizada em tampão acetato 200 mM e pH 4,5, em que a atividade enzimática observada foi de 15 U.

Os resultados experimentais de atividade enzimática para imobilização em Amberlite XAD761 estão apresentados na Tabela 4.2.

Capítulo 4 - Resultados e discussão

Tabela 4.2. Atividade enzimática (U) da enzima imobilizada em Duolite A568

Tampão	Acetato 200 mM pH 4,5
Atividade	250

Os testes com Duolite A568 em tampão acetato pH 4,5 foram conduzidos de acordo com o trabalho de Guidini et al. (2010) que testaram a imobilização da enzima β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* em Duolite A568 em diferentes tampões e condições de pH e obtiveram melhor atividade quando utilizaram o tampão acetato com pH 4,5.

A resina Duolite A568 apresentou maior retenção de enzima β -galactosidase, com atividade enzimática de 250 U quando comparado com a atividade obtida nos testes com Amberlite XAD761. Marquez (2007) e Guidini (2009) realizaram testes preliminares com diferentes resinas para imobilização de invertase de *Saccharomyces cerevisiae* e β -galactosidase de *Aspergillus oryzae*, respectivamente, e observaram maior retenção enzimática em Duolite A568 quando comparado às outras resinas.

Corroborando com os resultados de Marquez (2007) e Guidini (2009), Kim, Lim e Oh (2012) testaram diferentes resinas como suporte para imobilização de endo e exo-arabinanases de *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* para conversão de açúcar de beterraba, dentre elas Duolite A568 e Amberlite XAD761. Os autores verificaram um rendimento de conversão de 80% para a enzima imobilizada em Duolite A568, enquanto as outras resinas estudadas apresentaram rendimento de conversão entre 25% e 43%, demonstrando a superioridade da Duolite A568 em comparação à Amberlite XAD761 em relação à imobilização de enzimas.

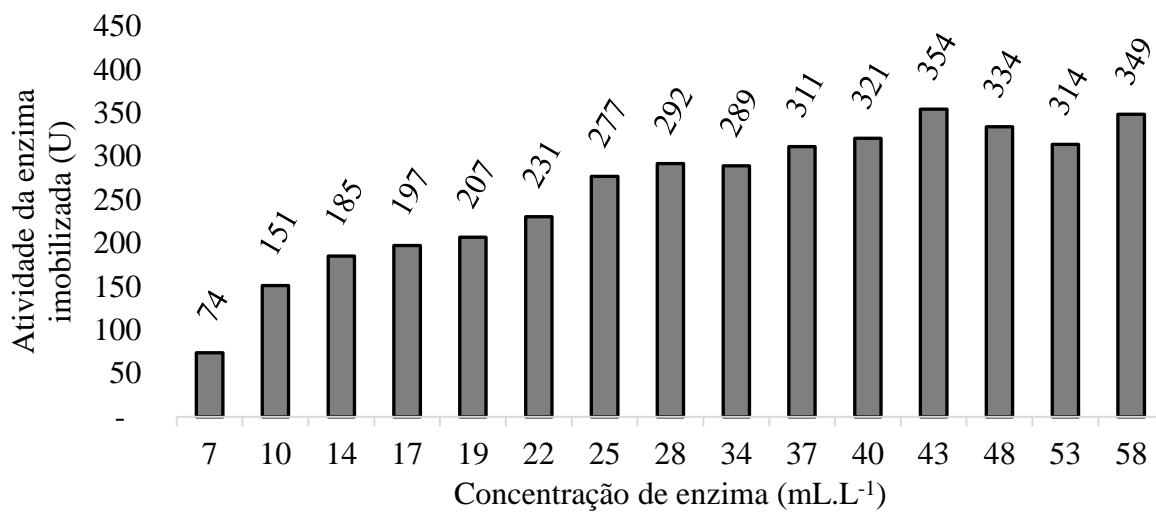
Assim, foi definido que seria utilizado apenas a resina Duolite A568 no presente trabalho, uma vez que apresentou uma atividade enzimática superior à resina Amberlite XAD761.

4.2. Influência da concentração de β -galactosidase no processo de imobilização.

Os resultados da influência da concentração de β -galactosidase no processo de imobilização na atividade enzimática do suporte estão apresentados na Figura 4.1

Capítulo 4 - Resultados e discussão

Figura 4.1. Atividade enzimática em diferentes concentrações de enzima, utilizando o suporte Duolite A568 na quantidade de 0,5 g.



Pelos resultados apresentados observa-se que o aumento da concentração de enzima na solução de immobilização influenciou diretamente no aumento da atividade da enzima immobilizada até a concentração de 43 mL.L⁻¹. A partir dessa concentração a atividade da enzima immobilizada se manteve praticamente constante não sendo observado aumento da atividade enzimática do immobilizado com o incremento da concentração de enzima na solução de immobilização.

Campello et al. (2012) ao estudarem a immobilização de β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* em Eupergit® C variaram a quantidade de enzima ofertada na solução de immobilização em 0,1, 0,25 e 0,4 mL e foi verificado maior atividade quando ofertado 0,4 mL de enzima para immobilização em 10 mL de solução enzimática.

De acordo com Gürdaş, Güleç e Mutlu (2012), ao estudarem immobilização de β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* em Duolite A 568, um aumento na concentração de enzima na solução de immobilização levou a um aumento na eficiência de immobilização até a concentração de β -galactosidase de 6 mg.mL⁻¹. Entretanto, o aumento acima dessa concentração não apresentou acréscimo notável de atividade da enzima immobilizada, condição semelhante foi encontrada no presente trabalho, sugerindo a ocorrência do impedimento estérico devido à immobilização em excesso de enzima no suporte.

Outros estudos recentes optaram por avaliar a influência da quantidade de suporte ofertado na immobilização. Santos (2014) verificou em seu trabalho de immobilização de lipase em celite que o aumento da proporção entre a quantidade de suporte e enzima, houve uma influência positiva tanto na atividade como na eficiência de immobilização, sugerindo que maiores quantidades de suporte proporcionam mais espaços físicos para a immobilização das enzimas,

Capítulo 4 - Resultados e discussão

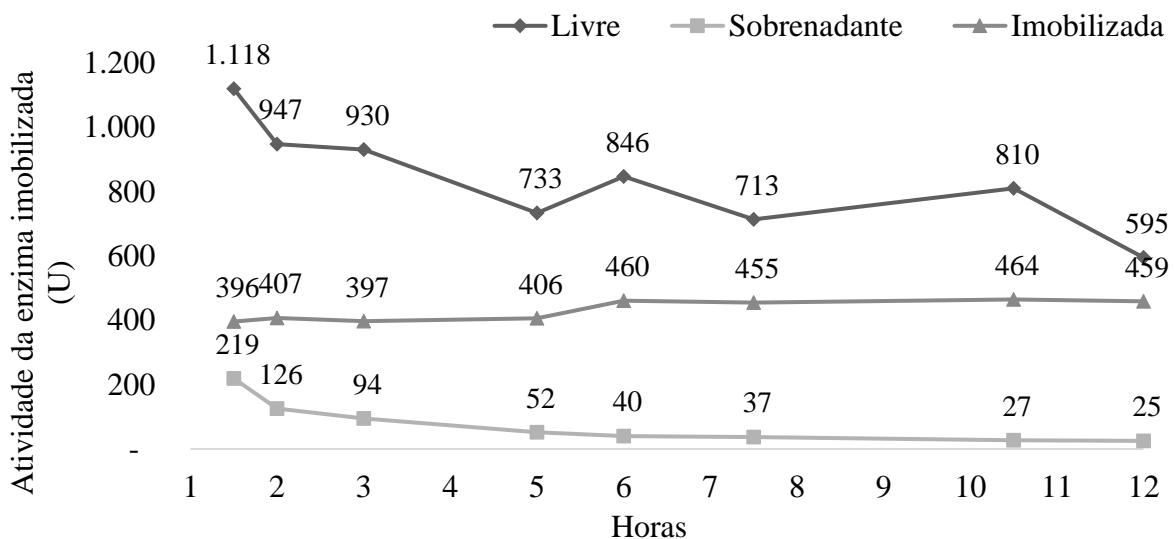
inversamente, quando a quantidade de suporte é diminuída, provoca-se a formação de agregados enzimáticos, levando à competição por espaços na superfície do suporte.

Desta forma, após análise crítica dos resultados obtidos, a concentração enzimática de 43 mL.L^{-1} foi escolhida para a sequência deste trabalho, considerando que foi a concentração que apresentou maior atividade enzimática imobilizada.

4.3. Influência do tempo na atividade da enzima imobilizada.

Na Figura 4.2 estão apresentadas as atividades das enzimas na forma livre, imobilizada e do sobrenadante da imobilização nos tempos de 1,5 a 12 horas de imobilização, em temperatura ambiente (aproximadamente 25°C). No tempo de 12 horas, a atividade da enzima livre observada foi de 595 U, que corresponde à 53% da atividade observada no tempo de 1,5 hora que foi de 1.118 U, sugerindo que as condições utilizadas no processo de imobilização afetam significativamente a atividade da enzima livre.

Figura 4.2. Influência do tempo de imobilização na atividade da enzima na forma livre, imobilizada e do sobrenadante da imobilização



Após o tempo de 6 horas de imobilização é possível notar que a atividade da enzima imobilizada se mantém até o tempo de 12 horas, sugerindo que, ao contrário do que ocorre com a enzima na forma livre, o processo de imobilização protege a enzima de ações externas, como por exemplo, o pH baixo utilizado na solução de imobilização (pH 4,5). Apesar deste valor de pH estar dentro da faixa definida como pH ótimo para a enzima pelo fabricante, 4,2 a 9,0, ele

Capítulo 4 - Resultados e discussão

está próximo ao limite mínimo, prejudicando a estabilidade da enzima e favorecendo sua inativação.

A baixa atividade do sobrenadante (52 a 25 U) a partir do tempo de 5 horas de imobilização sugere uma alta taxa da imobilização, resultado confirmado pelo rendimento de imobilização, que neste experimento foi de 93% e nos tempos subsequentes foram superiores à 95% (Tabela 4.3). Estes resultados indicam que as primeiras ligações entre moléculas de enzima e suporte são construídas rapidamente. Também pode ser reforçada a hipótese impedimento estérico que é a ocorrência da saturação da atividade imobilizada, uma vez que o rendimento de imobilização no tempo de 5 horas foi alto, mas a recuperação da atividade não foi equivalente, atingindo uma proporção de 54%.

Tabela 4.3. Efeito do tempo no processo de imobilização.

	Tempo de imobilização							
	01:30	02:00	03:00	05:00	06:00	07:30	10:30	12:00
<i>Rendimento de imobilização</i>	80%	87%	90%	93%	95%	95%	97%	96%
<i>Eficiência da imobilização</i>	44%	50%	47%	60%	57%	67%	59%	81%
<i>Recuperação da atividade</i>	35%	43%	43%	55%	54%	64%	57%	77%

Lima et al. (2013) também verificaram que maiores rendimentos de imobilização foram obtidos com um aumento do tempo de contato quando estudaram os tempos de imobilização de β -galactosidase de *K. lactis* em quitosana por 5, 10 e 24 horas. No entanto, também foi possível verificar que apesar do aumento do rendimento de imobilização, não houve aumento da recuperação da atividade, e após 10 h de contato não houve aumento adicional na atividade da enzima e na recuperação da atividade, apesar do aumento da carga enzimática no suporte.

É ilusório definir o tempo de imobilização de 12 horas como melhor condição, baseando apenas nos resultados obtidos de 81% e 77% para Eficiência de Imobilização e Recuperação da Atividade respectivamente, pois há de se ponderar que as circunstâncias da imobilização alteraram significativamente a atividade da enzima livre, que neste experimento foi de 595 U, e que este resultado é utilizado nas equações (3.4) e (3.5) que definem tais parâmetros.

Considerando a atividade da enzima imobilizada e conforme já debatido, o tempo de 6 horas poderia ser apontado como a melhor condição de imobilização, já que a partir deste período, não há aumento expressivo da atividade da enzima imobilizada, porém, com o objetivo

Capítulo 4 - Resultados e discussão

de otimizar o tempo de imobilização, foi realizado um experimento em duplicata para comparar a atividade da enzima imobilizada com os tempos de 2 e 6 horas de imobilização e os resultados obtidos são apresentados na Tabela 4.4.

Tabela 4.4. Resultado da influência do tempo de imobilização na atividade da enzima imobilizada

Tempo de imobilização	Atividade da enzima imobilizada
2 horas	417 ± 27
6 horas	430 ± 32

Realizando a análise de variância (ANOVA) visualizada na Tabela 4.5, verifica-se que não há diferença significativa entre os tratamentos, uma vez que o F calculado (F_{calc}) foi muito inferior ao F tabelado (F_T) para um nível de significância de 5%.

Tabela 4.5. ANOVA para o tempo de imobilização

Fonte da variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado médio	F_{calc}	p-valor
Tratamentos	432,80	1	432,81	0,4938	0,5022
Resíduos	7011,55	8	876,44		
Total	7444,36	9			
$F_T = F_{1, 8; 0,05} = 5,318$					

De acordo com os resultados obtidos, foi definido o tempo de 2 horas como o tempo de imobilização para os próximos experimentos.

4.4. Influência da presença do substrato no processo de imobilização

Este experimento foi conduzido com o objetivo de avaliar se a imobilização da enzima na presença do substrato influenciaria na atividade do imobilizado considerando que o substrato, ao se ligar à enzima, estaria de alguma forma protegendo o sítio ativo de sofrer impedimentos estéricos ou inativação devido à imobilização. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 4.6.

Capítulo 4 - Resultados e discussão

Tabela 4.6. Resultados do efeito da adição do substrato no processo de imobilização à temperatura ambiente (aproximadamente 25°C).

Condição	Atividade (U)
Sem substrato	406 ± 34
Com substrato	403 ± 0

As médias observadas na Tabela 4.6 sugerem que a presença do substrato no meio de imobilização não favorece o aumento da atividade da enzima imobilizada. Falleiros et al. (2017) também verificou que não houve influência da presença do substrato quando estudou a imobilização de β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* em Duolite A568.

Considerando que a atividade da enzima é influenciada pela temperatura da reação, na temperatura estudada, aproximadamente 25°C, a reação de hidrólise da lactose ocorre de forma mais rápida do que o tempo de imobilização, sugere-se então que o substrato é consumido rapidamente e não estará disponível para se ligar à enzima durante todo o processo de imobilização.

Desta forma, foi proposto a realização de um experimento à temperatura de 10°C supondo que, com a redução da temperatura e da velocidade de reação da hidrólise, o substrato ficaria em contato por mais tempo à enzima e favoreceria a sua ligação ao suporte, influenciando na atividade da enzima imobilizada. Os resultados podem ser observados na Tabela 4.7

Tabela 4.7. Resultados do efeito da adição do substrato no processo de imobilização à 10 °C

Condição	Atividade (U)
Sem substrato	389 ± 16
Com substrato	397 ± 1

De acordo com os resultados apresentados, foi verificado que, mesmo às baixas temperaturas, a presença do substrato não influenciou na atividade da enzima imobilizada. Portanto, é possível concluir que o sítio ativo não tem relação no processo de imobilização, logo, a adição do substrato na solução de imobilização torna-se supérflua considerando que a lactose não tem a condição de protetora do sítio ativo da enzima durante a imobilização e não melhora a performance da enzima imobilizada (FALLEIROS et al., 2017).

4.5. Influência do tampão e da força iônica na atividade da enzima imobilizada

Os resultados obtidos para o estudo da influência do tampão e da força iônica na atividade da enzima imobilizada são apresentados na Tabela 4.8

Tabela 4.8. Resultado da influência do tampão e da força iônica na atividade da enzima imobilizada

Força Iônica	Tampão	
	BR	Acetato
40 mM	435	347
200 mM	318	406

É possível verificar através dos resultados que o tampão e a força iônica tem influência na atividade da enzima imobilizada, mas não foi verificado uma tendência em relação a força iônica, isto é, se a melhor condição seria em baixa ou alta molaridades, pois, enquanto para o tampão BR a menor força iônica proporcionou uma maior atividade imobilizada, para o tampão acetado, a maior força iônica promove maior atividade imobilizada.

Pessela et al. (2005) imobilizaram diferentes enzimas, dentre elas, a β -galactosidase de *Aspergillus oryzae*, em suportes de agarose recoberto com polietilenoimina, e o processo de imobilização foi realizado com diferentes forças iônicas (5, 50, 100, 300, 500 e 700 mM NaCl). Neste estudo, verificaram que, em geral, quando a força iônica foi maior, a taxa de adsorção foi menor, principalmente quando foram utilizadas concentrações salinas acima de 100 mM, porém, quando as enzimas foram adsorvidas em maiores concentrações de NaCl, a força de adsorção foi em todos os casos muito maior do que quando foi realizada sob a baixa força iônica usual.

Em contrapartida, Mateo et al. (2002) e Torres e Batista-Vieira (2012) ao estudarem a imobilização de penicilina G-acilase e β -galactosidase, respectivamente, em Sapebeads-EP verificaram que soluções de imobilização com maior força iônica proporcionam maior retenção da atividade enzimática.

Conclui-se que o rendimento de imobilização pode depender da natureza e força iônica do tampão utilizado (HOMAEI et al., 2013). Logo, para a sequência deste trabalho, o tampão BR foi escolhido considerando que ele apresentou boa atividade imobilizada quando utilizado com baixa força iônica (40 mM) e possui uma ampla faixa de pH ajustável, sendo possível utilizá-lo no pH 2 ao 12.

4.6. Influência conjunta da concentração da enzima, força iônica e pH da solução de imobilização na atividade da enzima imobilizada

A matriz do Planejamento Composto Central Rotacional proposto está apresentada na Tabela 4.9, tendo como resposta a atividade da enzima imobilizada.

Tabela 4.9. Matriz do Planejamento Composto Central Rotacional para imobilização de β -galactosidase com valores reais (codificados) e atividade da enzima imobilizada

Ensaio	Concentração da enzima (ml.L ⁻¹)	Força Iônica do tampão (mM)	pH	Atividade da enzima imobilizada (U)
1	28 (-1)	60 (-1)	4,0 (-1)	346
2	43 (+1)	60 (-1)	4,0 (-1)	430
3	28 (-1)	170 (+1)	4,0 (-1)	314
4	43 (+1)	170 (+1)	4,0 (-1)	361
5	28 (-1)	60 (-1)	9,0 (+1)	187
6	43 (+1)	60 (-1)	9,0 (+1)	232
7	28 (-1)	170 (+1)	9,0 (+1)	135
8	43 (+1)	170 (+1)	9,0 (+1)	203
9	23 (- α)	120 (0)	6,5 (0)	239
10	48 (+ α)	120 (0)	6,5 (0)	342
11	35,5 (0)	20 (- α)	6,5 (0)	388
12	35,5 (0)	210 (+ α)	6,5 (0)	245
13	35,5 (0)	120 (0)	2,3 (- α)	4
14	35,5 (0)	120 (0)	10,7 (+ α)	18
15	35,5 (0)	120 (0)	6,5 (0)	267
16	35,5 (0)	120 (0)	6,5 (0)	271
17	35,5 (0)	120 (0)	6,5 (0)	281

Foi realizada uma regressão múltipla para avaliar a influência das variáveis independentes estudadas (concentração da enzima, força iônica e pH) na atividade da enzima imobilizada, sendo que foram desconsiderados os parâmetros que apresentaram nível de significância maior que 10%, ou seja, no teste de hipótese com a tabela *t* de *Student* foi considerada a probabilidade máxima de erro de 10%. Foi utilizado o software *Statistica 12.0* e os resultados obtidos são apresentados na Tabela 4.10.

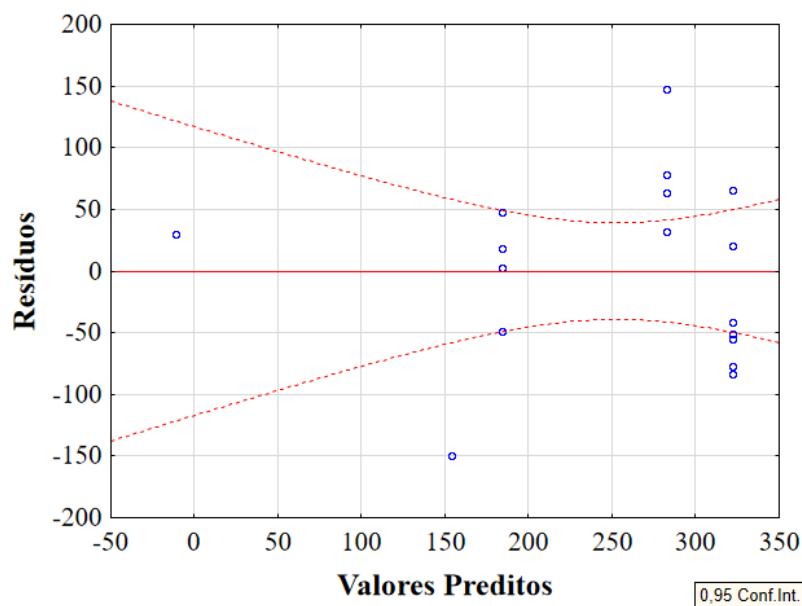
Capítulo 4 - Resultados e discussão

Tabela 4.10. Coeficientes de regressão, erro padrão e nível de significância estatística (valor de p) dos fatores significativos do modelo para atividade da enzima imobilizada.

Fator	Coeficiente de regressão	Erro Padrão	p-valor
Média	321,8764	25,8283	0,0000
X_3	-49,1185	21,2321	0,0364
$X_3 \times X_3$	-88,5830	21,7377	0,0011
$X_3 = \text{pH}$			

O coeficiente de determinação (R^2) para o modelo ajustado foi de 0,5550, mostrando que o modelo empírico explicou apenas 55,50% da variabilidade dos dados observados para atividade da enzima imobilizada. Na Figura 4.3 está apresentada a análise de resíduos para o ajuste.

Figura 4.3. Distribuição de resíduos relativos à atividade da enzima imobilizada



Para que o modelo seja válido e adequado para representar o fenômeno, os resíduos da regressão devem ser aleatórios e normalmente distribuídos em torno de uma média igual à zero, com variância constante e não apresentar tendência quanto à distribuição.

Avaliando a Figura 4.3, os resíduos da regressão relativos à atividade da enzima imobilizada estão aleatoriamente em torno de zero e não apresentam tendência quanto à distribuição, com exceção dos pontos relativos aos ensaios 13 e 14 que possuem valor de resíduo -149,90 e 29,46, respectivamente. Nestes dois ensaios, a variável pH está nos níveis “-

Capítulo 4 - Resultados e discussão

α " (2,3) e " $+\alpha$ " (10,7), que resultou em atividades 4 U e 18 U, respectivamente. Estas condições podem ser consideradas muito extremas para a enzima β -galactosidase de *Bacillus licheniformis* considerando que a especificação do fornecedor determinar o pH ótimo da enzima como entre 4,0 e 9,0, logo, era de se esperar que o modelo não preveria a desnaturação da enzima nestas condições que resultariam em uma baixa taxa de imobilização.

Assim, pela análise dos resíduos, eliminou-se os ensaios 13 e 14 e realizou-se novamente a regressão múltipla. Na Tabela 4.11 são mostrados os novos fatores significativos encontrados, considerando um nível de significância de 10%.

Tabela 4.11. Coeficientes de regressão, erro padrão e nível de significância estatística (valor de p) dos fatores significativos do modelo para atividade da enzima imobilizada, após retirar os ensaios 13 e 14.

Fator	Coeficiente de regressão	Erro Padrão	p-valor
Média	280,0068	7,2363	0,000000
X_1	30,6163	4,3785	0,000064
X_2	-30,8406	4,3785	0,000060
X_3	-86,8248	5,7208	0,000000
$X_2 \times X_2$	12,8812	4,7864	0,024747
$X_3 \times X_3$	-17,0116	8,4246	0,074208

X_1 = Concentração da enzima; X_2 = Força iônica; X_3 = pH.

O coeficiente de determinação R^2 foi de 0,9598, indicando um ajuste adequado do modelo e que 95,98% da variabilidade dos dados experimentais foram aplicados pela equação empírica proposta. Utilizando os resultados para atividade da enzima imobilizada apresentados na Tabela 4.11, após a regressão múltipla, obteve-se a Equação 4.1 com os parâmetros significativos.

Atividade da enzima imobilizada

$$= 280,0068 + 30,6163X_1 - 30,8406X_2 - 86,8248X_3 + 12,8812X_2^2 - 17,0116X_3^2 \quad (4.1)$$

Na Figura 4.4 é possível visualizar que a distribuição dos resíduos comportaram-se aleatoriamente em torno de zero, sem apresentar tendências quanto à distribuição. E na Figura 4.5 verifica-se que as respostas experimentais obtidas para atividade da enzima imobilizada apresentaram valores próximos aos fornecidos pela Equação 4.1.

Capítulo 4 - Resultados e discussão

Figura 4.4. Distribuição dos resíduos relativos à atividade da enzima imobilizada após retirar os ensaios 12 e 13.

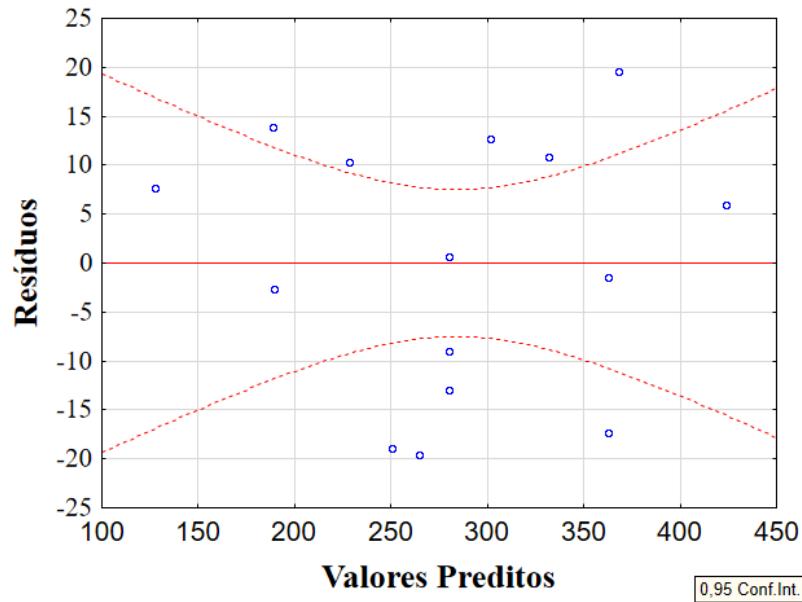
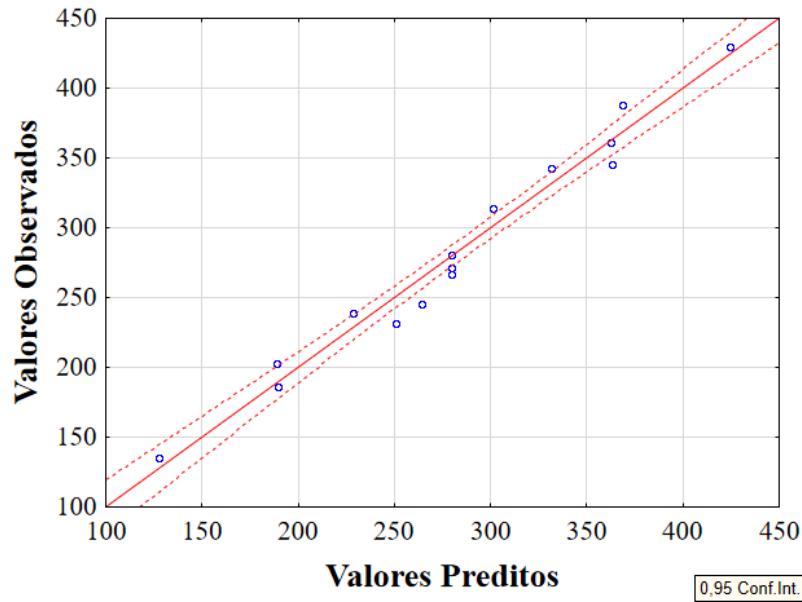


Figura 4.5. Valores preditos em relação aos observados da atividade da enzima imobilizada após retirar os ensaios 12 e 13.



Com o modelo obtido foi possível construir as superfícies de resposta da concentração de enzima, força iônica e pH na atividade da enzima β -galactosidase de *Bacillus licheniformis* em Duolite A568, que são apresentadas nas Figuras 4.6, 4.7 e 4.8.

Capítulo 4 - Resultados e discussão

Figura 4.6. Superfície de resposta da influência da concentração da enzima e da força iônica na atividade da enzima imobilizada

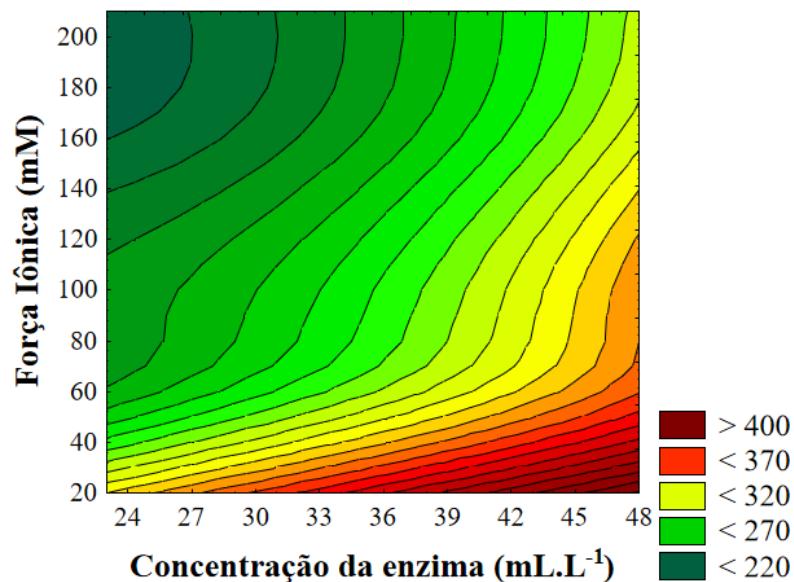


Figura 4.7. Superfície de resposta da influência da concentração da enzima e do pH na atividade da enzima imobilizada

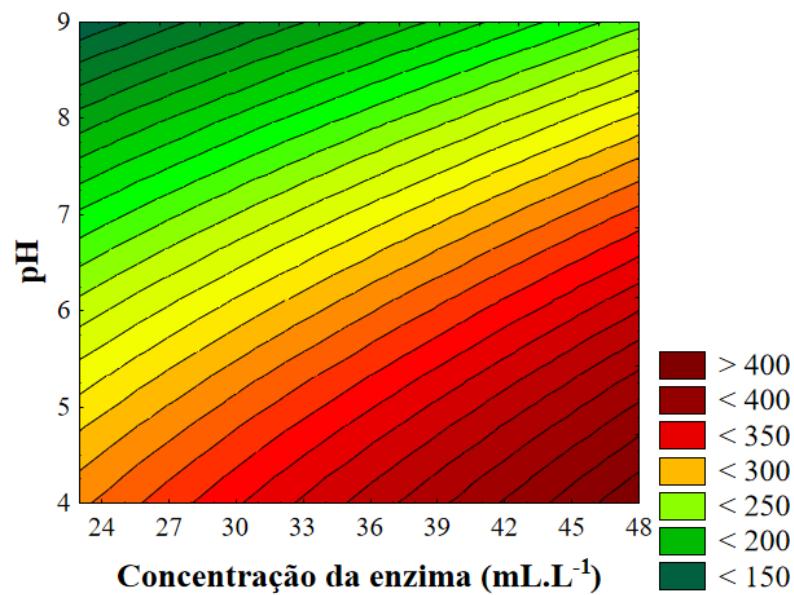
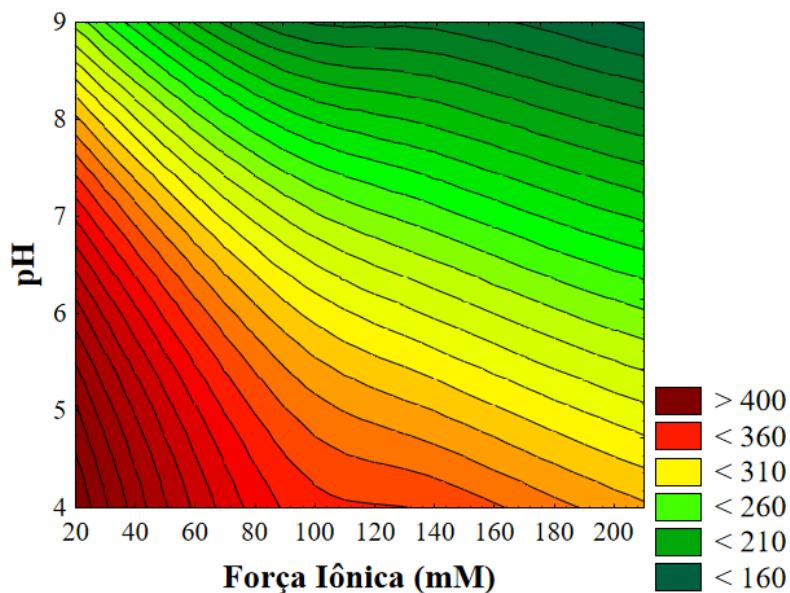


Figura 4.8. Superfície de resposta da influência da força iônica e do pH na atividade da enzima imobilizada



De acordo com os resultados, verificou-se que os três parâmetros estudados, concentração da enzima, força iônica e o pH, tiveram influência significativa na atividade da enzima imobilizada, mas não houve interação entre eles. A atividade da enzima imobilizada da enzima β -galactosidase de *Bacillus licheniformis* em Duolite A568 variou de 4 a 430 U, este último, obtido nas condições de 43 mL.L⁻¹ de concentração de enzima e solução tampão BR com força iônica de 60 mM e pH 4,0.

Observou-se claramente que o pH afetou significativamente a atividade da enzima imobilizada, os resultados indicaram que, nos ensaios com pH 4,0 (ensaios 1, 2, 3 e 4) a taxa de imobilização foi consideravelmente maior (entre 314 U e 430 U) em relação aos ensaios com pH 9,0 (ensaios 5, 6, 7 e 8), onde a atividade do biocatalisador imobilizado foi entre 135 U e 203 U. Resultados estes, que corroboram com trabalhos progressos de imobilização de β -galactosidase de *A. oryzae* em Duolite A-568, que indicaram pH ótimo de imobilização de 4,5 quando estudada uma faixa de pH de 3,5 a 5,65 (GUIDINI et al., 2010) e pH de 3,0 a 8,0 (GÜRDAS; GÜLEÇ; MUTLU, 2012). Adicionalmente também foi verificado claramente por Gürdaş, Güleç e Mutlu (2012) que houve uma adsorção considerável (com > 90% de atividade) no intervalo de pH 3,0 a pH 4,5.

Estudos de imobilização de β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* em diversos suportes apresentaram diferentes respostas para a influência do pH na atividade imobilizada. Parizzi (2015) não verificou diferença significativa quando utilizou criogel para a imobilização nas condições de pH de 4,0, 7,0 e 9,0. Wahba e Hassan (2015) verificaram melhor imobilização da

Capítulo 4 - Resultados e discussão

enzima em pH 10,0 quando utilizou ágar enxertados como suporte. Enquanto os trabalhos de Guidini et al. (2010) e Carević et al. (2016), em que foram utilizadas resinas, Duolite A-568 e Purolite A109 respectivamente, indicaram melhor condição de imobilização em pH entre 4,0 e 5,0. Tais evidências demonstram que a condição de pH da imobilização está mais relacionada ao suporte utilizado do que às características da enzima propriamente dita.

Carević et al. (2016) verificaram correlação na influência do pH e da força iônica na atividade da enzima imobilizada. Em baixa força iônica (0,1 M), as atividades imobilizadas foram substancialmente superiores às atividades imobilizada em alta força iônica (1 M), em qualquer valor de pH, porém, em baixa força iônica, pH inferiores (4,0 e 5,0) apresentaram maior influência na taxa de imobilização do que em situações com pH de 6,0 e 7,0, enquanto que em todos os experimentos com alta força iônica a variação de pH não melhorou a taxa de imobilização.

Apesar de as interações entre as variáveis estudadas não terem sido significativas, a influência da força iônica foi relevante à ponto de, em condições de baixa força iônica (<20 mM) foi possível atingir atividade da enzima imobilizada superior a 360 U em pH entre 4,0 e 7,0 (Figura 4.8), resultado demonstrado no ensaio 11. Albuquerque et al. (2016) apontaram o meio de imobilização com tampão fosfato 1,4 M como responsável pela inativação em altas cargas enzimáticas, enquanto que as perdas de atividade não ocorreram no caso de condições mais amenas (tampão fosfato 20 mM) para imobilizar a β -galactosidase em Sepabeads HFA.

De acordo com os resultados apresentados nas superfícies de respostas das Figuras 4.6, 4.7 e 4.8, pode-se destacar como condições ótimas de imobilização a concentração da enzima acima de 43 mL.L^{-1} , a força iônica abaixo de 40 mM e o pH abaixo de 4,0. Desta forma, foi realizado um teste para avaliar se a alteração da força iônica de 60 mM para 40mM acarretaria em um incremento na atividade da enzima imobilizada, os resultados são apresentados na Tabela 4.12 e foram avaliados através de Análise de Variância (ANOVA) (Tabela 4.13).

Tabela 4.12. Resultado da influência da força iônica na atividade da enzima imobilizada

Força Iônica	Atividade (U)
40 mM	472 \pm 15
60 mM	406 \pm 23

Tabela 4.13. ANOVA para força iônica

Fonte da variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado médio	F _{calc}	p-valor
Tratamentos	6542,2	1	6542,234	17,0018	0,014573
Resíduos	1539,2	4	384,794		
Total	8081,4	5			
$F_T = F_{1, 5; 0,05} = 7,709$					

Considerando os resultados apresentados, verifica-se que há diferença significativa entre os tratamentos, uma vez que o F calculado (F_{calc}) foi maior que o F tabelado (F_T) para um nível de significância de 5%. Portanto houve incremento na atividade da enzima imobilizada quando a força iônica foi alterada de 60 mM para 40 mM. Desta forma, para as próximas etapas deste trabalho as condições de imobilização foram definidas como concentração de enzima 43 mL.L⁻¹ e solução tampão BR com força iônica de 40 mM e pH 4,0.

4.7. Influência de ligações cruzadas e multipontuais na atividade da enzima imobilizada

Com o intuito de obter um biocatalisador com maior estabilidade foi proposto um estudo para verificar a influência de ligações cruzadas e multipontuais na atividade da enzima imobilizada. Os resultados dos experimentos realizados são apresentados na Tabela 4.14. Atividade Relativa à atividade da enzima imobilizada.

Tabela 4.14. Resultados dos experimentos para o processo de ligações cruzadas e multipontuais.

Condição	Atividade (U)	Atividade Relativa
Imobilização (resultados pregressos)	472 ± 15	-
Imobilização + Reticulação (3,5 g.L ⁻¹ de Glu) + Estabilização ¹	$44 \pm 1,1$	9%
Imobilização + Reticulação (3,5 g.L ⁻¹ de Glu) + Estabilização ²	$106 \pm 1,5$	22%
Imobilização + Estabilização	$159 \pm 7,6$	34%
Imobilização + Reticulação (1,0 g.L ⁻¹ de Glu)	$472 \pm 28,5$	100%
Imobilização + Reticulação (2,0 g.L ⁻¹ de Glu)	$423 \pm 14,9$	90%
Imobilização + Reticulação (3,5 g.L ⁻¹ de Glu)	$231 \pm 44,8$	49%

¹Com descarte do sobrenadante; ²Sem descarte do sobrenadante

Capítulo 4 - Resultados e discussão

A partir dos dados apresentados, é possível observar que a introdução do processo de estabilização da enzima imobilizada, através da incubação em solução tampão pH 9,0, alterou a conformação da enzima e reduziu consideravelmente a atividade imobilizada em todos os experimentos. Diferente destes resultados, Falleiros et al. (2017) ao explorar a imobilização de β -galactosidase de *Aspergillus oryzae*, verificaram que a etapa de estabilização melhorou a atividade imobilizada em 24%, quando realizada isoladamente, e em 44% quando combinada com o processo de reticulação com glutaraldeído. Proteínas possuem áreas especialmente enriquecidas em grupos aniónicos e a variação no pH da imobilização durante a troca iônica pode modificar as propriedades funcionais da enzima imobilizada (Albuquerque et al., 2016).

Em contrapartida, a utilização de glutaraldeído como agente reticulante para formação de ligações cruzadas, teve influência significativa na atividade da enzima imobilizada. Baixas concentrações de glutaraldeído ($1,0 \text{ g.L}^{-1}$) não afetaram a atividade da enzima imobilizada, enquanto a concentração de $3,5 \text{ g.L}^{-1}$ provocou uma redução de 50% na atividade do biocatalisador. Costa et al. (2013) verificaram maior atividade da enzima imobilizada quando não adicionou a etapa de reticulação ou a fez antes do processo de imobilização, e, corroborando com este trabalho, observou menor atividade enzimática retida no experimento que utilizou a maior concentração de glutaraldeído 5,8% (v/v). Os autores elucidaram que isso pode ser explicado pelas ligações cruzadas entre os aminoácidos na molécula de proteína, que podem alterar a configuração conformacional da cadeia polipeptídica, afetando o sítio ativo da enzima quando a reação de glutaraldeído ocorre durante ou após a imobilização do biocatalisador no suporte.

Para alcançar a reticulação de proteínas ideal, parece adequado usar concentrações moderadas de glutaraldeído, altas o suficiente para garantir a ativação da maioria dos grupos amino da enzima com uma molécula de glutaraldeído, mas não muito altas para não atingir ativações com duas moléculas por grupo amino. Em alguns casos, pode ser necessário utilizar condições de reticulação brandas se a proteína for especialmente sensível às modificações do glutaraldeído (Barbosa et al., 2014).

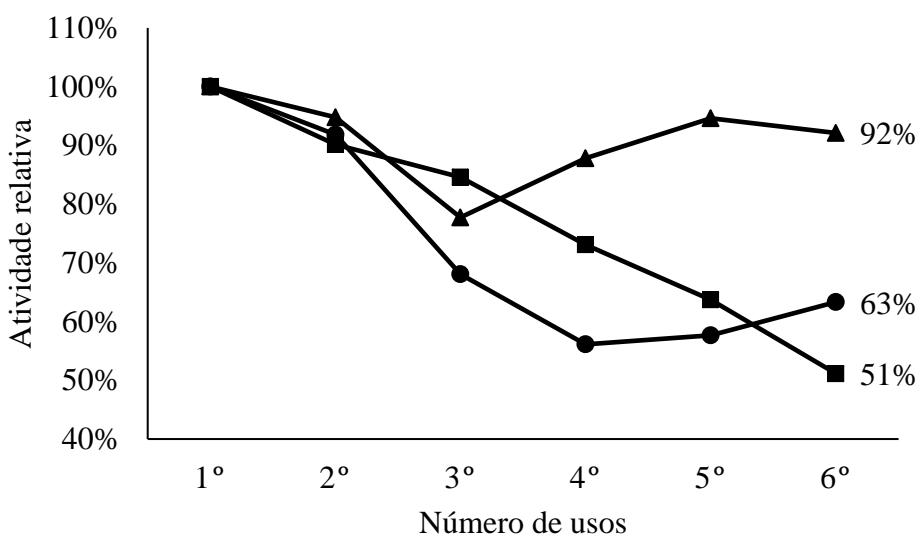
4.8. Estabilidade da enzima imobilizada

Os resultados obtidos para os testes preliminares de estabilidade da enzima imobilizada e reticuladas são apresentados na Tabela 4.15 e na Figura 4.9.

Capítulo 4 - Resultados e discussão

Tabela 4.15. Atividade da enzima imobilizada, à 40 °C, após 6 usos.

Concentração de Glutaraldeído	1º uso	2º uso	3º uso	4º uso	5º uso	6º uso
1,0 g.L ⁻¹	472	434	321	265	272	299
2,0 g.L ⁻¹	423	382	358	310	270	217
3,5 g.L ⁻¹	231	219	179	203	218	213

Figura 4.9. Atividade relativa (U/U_0) da β -galactosidase imobilizada e reticulada com 1,0 g.L⁻¹ (●), 2,0 g.L⁻¹ (■) e 3,5 g.L⁻¹ (▲).

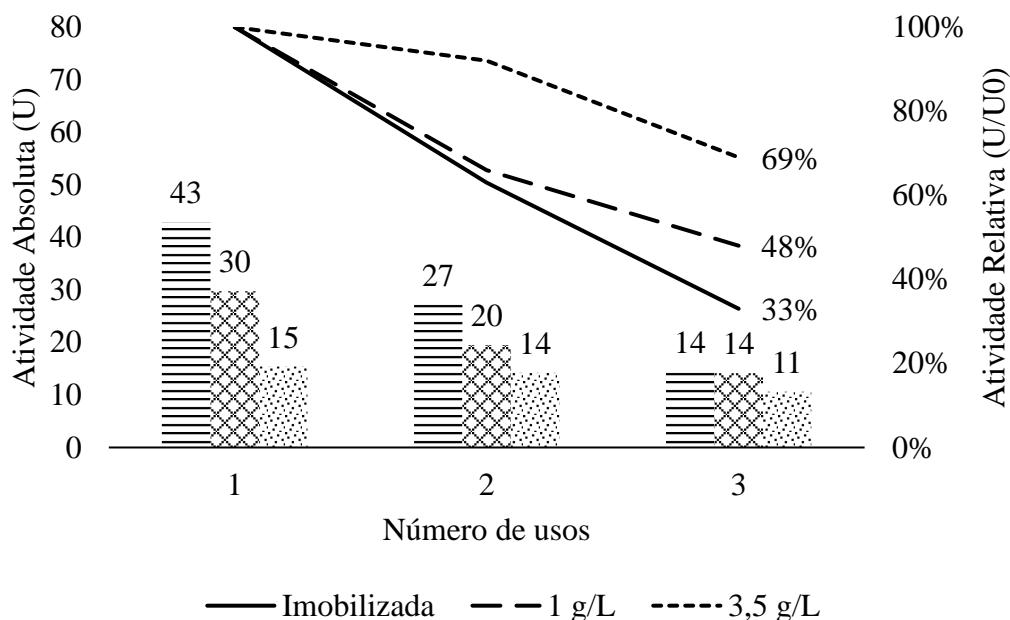
Após análises dos dados obtidos, é possível observar que a atividade da enzima reticulada com glutaraldeído com concentração de 1,0 g.L⁻¹ sofreu uma queda de 37%, em relação à sua atividade inicial, após 6 usos. Enquanto que, para a condição com 2,0 g.L⁻¹ de glutaraldeído, a atividade relativa foi de 51% e para a condição com 3,5 g.L⁻¹, 92%. Esses resultados ratificam que o tratamento com glutaraldeído foi eficaz na manutenção da estabilidade da enzima imobilizada em Duolite A-568, apesar de afetar substancialmente a atividade da enzima imobilizada. Os resultados obtidos vão de encontro ao exposto nos trabalhos de Guidini et al. (2010), Ansari et al. (2015), Eskandarloo e Abbaspourrad (2018) e Urrutia et al. (2018), que observaram uma maior estabilidade da atividade enzimática imobilizada seguida do processo de ligação cruzada utilizando glutaraldeído como agente reticulante, sendo possível a reutilização do biocatalisador.

Para os experimentos de hidrólise da lactose à temperatura de 5°C foram escolhidas as condições de reticulação com glutaraldeído nas concentrações de 1,0 g.L⁻¹ e 3,5 g.L⁻¹, resultados

Capítulo 4 - Resultados e discussão

estes que serão confrontados com os da enzima que passou apenas pelo processo de imobilização. Na Figura 4.10 são apresentados os resultados das atividades das enzimas imobilizadas após 3 usos à temperatura de 5°C.

Figura 4.10. Atividade da enzima imobilizada (\equiv), imobilizada e reticulada 1,0 g.L⁻¹ (\diamond) e imobilizada e reticulada 3,5 g.L⁻¹ (\circ), à 5°C, após 3 usos



De acordo com os resultados apresentados, a enzima que sofreu somente o processo de imobilização apresentou menor estabilidade em relação às enzimas que passaram pelo processo adicional de reticulação. Também foi possível verificar que houve uma maior queda da atividade absoluta e relativa ao longo dos usos em relação ao experimento anterior (Tabela 4.15 e Figura 4.9), possivelmente devido ao maior tempo de utilização da enzima imobilizada, que no experimento anterior foi de 15 minutos e neste, foi de 4 a 17 horas, conforme detalhado na Tabela 4.16.

Tabela 4.16. Tempo de hidrólise da lactose, em horas, utilizando os biocatalisadores imobilizados à 5°C.

Condição	1º uso	2º uso	3º uso
Imobilização	4,3	6,7	12,8
Imobilização + Reticulação (1,0 g.L ⁻¹ de Glu)	6,2	9,4	12,9
Imobilização + Reticulação (3,5 g.L ⁻¹ de Glu)	11,9	12,9	17,2

Capítulo 4 - Resultados e discussão

É possível apurar através dos resultados apresentados, que a atividade da enzima influencia consideravelmente no tempo necessário para que ocorra reação total de hidrólise da lactose, e consequentemente a enzima imobilizada, que iniciou o processo com maior atividade retida, apresentou menor tempo de hidrólise. Esta é uma condição importante que deverá ser considerada na escolha do biocatalisador, isto é, se será utilizado um biocatalisador com maior atividade inicial ou um com maior estabilidade ao uso.

Na Tabela 4.17 são apresentando os resultados para os experimentos que avaliaram a estabilidade da enzima imobilizada em relação ao armazenamento por 36 dias à 4°C.

Tabela 4.17. Atividade da enzima imobilizada no tempo 0 e após 36 dias de armazenamento à 4°C, em tampão BR 40 mM e pH 4,0.

Condição	Tempo (dias)		Atividade relativa
	0	36	
Imobilização	506	309	61,1%
Imobilização + Reticulação (1,0 g.L ⁻¹ de Glu)	468	283	60,5%
Imobilização + Reticulação (3,5 g.L ⁻¹ de Glu)	326	236	72,5%

Os resultados apresentados na Tabela 4.17 demonstram que a melhor estabilidade ao armazenamento da enzima imobilizada foi a condição de imobilização seguida de reticulação com glutaraldeído 3,5 g.L⁻¹, e que a condição com 1,0 g.L⁻¹ de glutaraldeído foi pouco eficiente na melhora da estabilidade da enzima ao armazenamento quando comparada com a atividade relativa da enzima que passou somente pela etapa de imobilização. Esses resultados já eram esperados pois foi verificado nos experimentos anteriores que o processo de reticulação melhora a estabilidade do biocatalisador imobilizado.

Guidini et al. (2010) obtiveram 100% de estabilidade da enzima β -galactosidase imobilizada e reticulada com glutaraldeído após 3 meses de armazenamento em tampão acetato pH 4,5 e 4 °C, enquanto Falleiros et al. (2017) alcançaram 95% de estabilidade ao armazenamento por 98 dias, também em tampão acetato pH e temperatura de 4°C, do biocatalisador imobilizado que passou pelas etapas de imobilização, estabilização e reticulação com glutaraldeído.

CAPÍTULO 5 – CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos pode-se concluir que:

- O uso de enzimas imobilizadas tem um impacto econômico uma vez que a enzima pode ser reutilizada na produção de lácteos com teor reduzido de lactose, diminuindo assim os custos de produção e do produto acabado.
- A resina Duolite A568 apresentou melhor retenção da atividade em enzimática em relação à Amberlite XAD761.
- As condições para o processo de imobilização de β -galactosidase de *Bacillus licheniformis* foi tempo de 2 horas, concentração de enzima de 43 mL.L^{-1} , tampão BR com força iônica 40 mM e pH 4,0.
- A utilização do substrato na concentração de 50 g.L^{-1} não influenciou a atividade da enzima imobilizada.
- O pH, força iônica e a concentração da enzima na solução de imobilização tem influência significativa na atividade enzimática retida no processo de imobilização.
- O processo de estabilização através da incubação da enzima imobilizada em solução tampão pH 9,0 afetou negativamente a atividade do biocatalisador.
- O processo de reticulação com Glutaraldeído impacta na atividade da enzima imobilizada mas melhora a estabilidade do biocatalisador.

CAPÍTULO 6 – SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Estudar a imobilização de β -galactosidase de *Bacillus licheniformis* imobilizada na resina Duolite A568 utilizando tampão acetato e tampão BR com altos valores de força iônica.
- Estudar as condições de dessorção da enzima β -galactosidase de *Bacillus licheniformis* imobilizada na resina Duolite A568.
- Avaliar o processo de hidrólise da lactose pela enzima imobilizada em reator de leito fluidizado.
- Estudar o processo de ligação da enzima ao suporte por microscopia eletrônica de varredura.
- Aplicar a enzima imobilizada em reações de hidrólise da lactose em leite e soro de leite.

CAPÍTULO 7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABLV – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE LEITE LOGA VIDA. **Intolerância a lactose.** Disponível em: <<http://www.leitefazseutipo.com.br/index.php/2016/12/12/intolerancia-a-lactose/>>. Acesso em: 26 de nov. 2017.

ALBUQUERQUE, T. L. DE; RUEDA, N.; SANTOS, J. C. S. DOS.; BARBOSA, O.; ORTIZ, C.; BINAY, B.; ÖZDEMIR, E.; GONÇALVES, L. R. B.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Easy stabilization of interfacially activated lipases using heterofunctional divinyl sulfone activated-octyl agarose beads. Modulation of the immobilized enzymes by altering their nanoenvironment. **Process Biochemistry**, v. 51, p. 865–874, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2016.04.002>

ALFAYA, A.; KUBOTA, L. A utilização de materiais obtidos pelo processo de sol-gel na construção de biossensores. **Química Nova**, v. 25, p. 835 – 841, 2002. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422002000500020>

ANTUNES, A. E. C.; PACHECO, M. T. B. **Leite para adultos: mitos e fatos frente à ciência**. São Paulo: Varela, 2009. p. 405-424.

ANSARI, S. A.; SATAR, R.; CHIBBER, S.; KHAN, M. J. Enhanced stability of *Kluyveromyces lactis* β -galactosidase immobilized on glutaraldehyde modified multiwalled carbon nanotubes. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 97, p. 258-263, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2013.09.008>

ANSARI, S. A.; SATAR, R.; ZAIDI, S. K.; NASEER, M. I.; KARIM, S.; ALQAHTANI, M. H.; RASOOL, M. Nanodiamonds as an effective and novel matrix for immobilizing β galactosidase. **Food and Bioproducts Processing**, v. 95, p. 298 – 303, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2014.10.014>

AYAZ, N.; ALNAHDI H.; DANIAL E.N. Immobilization and Properties of β -D-galactosidase from *Bacillus licheniformis* E66. **Journal of Applied Sciences Research**. v. 7 n.12, p. 2448-2454, 2011.

BARBOSA, O.; ORTIZ, C.; BERENGUER-MURCIA, A.; TORRES, R.; RODRIGUES, R. C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Glutaraldehyde in bio-catalysts design: a useful crosslinker and a versatile tool in enzyme immobilization. **RSC Advances**, v. 4, p. 1583 - 1600, 2014. <https://doi.org/10.1039/C3RA45991H>

BAROKE, S. O Futuro dos Produtos Lácteos sem Lactose. Ingredientes e Aditivos, São Paulo. n. 128, p. 6-8, mai. 2016. Disponível em: <<http://www.abia.org.br/vsn/temp/z201666Ofuturodosprodutoslacteossemleactose.pdf>>. Acesso em: 12 de Agosto de 2018.

BENJAMINS, E.; BOXEM, L.; KLEINJAN-NOEVERMAN, J.; BROEKHUIS, T. A. Assessment of repetitive batch-wise synthesis of galacto-oligosaccharides from lactose slurry using immobilised β -galactosidase from *Bacillus circulans*. **International Dairy Journal**, v. 38, p. 160-168, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2014.03.011>

Capítulo 5 – Referências Bibliográficas

BERTONI, S.; ALBERTINI, B.; DOLCI, L. S.; PASSERINI, N. Spray congealed lipid microparticles for the local delivery of β -galactosidase to the small intestine. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 132, p. 1-10, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2018.08.014>

BRAGA, A. R. C.; SILVA, M. F.; OLIVEIRA, J. V.; TREICHEL, H.; KALIL, S. J. A new approach to evaluate immobilization of β -galactosidase on Eupergit® C: structural, kinetic, and thermal characterization. **Química Nova**, v. 37, p. 796-803, 2014. <https://doi.org/10.5935/0100-4042.20140128>

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62, de 29 de dezembro de 2011. **Diário Oficial da União**, 30 dez. 2011.

BRASIL. Resolução da Diretoria Colegiada RDC nº 53, de 07 de outubro de 2014. **Dispõe sobre a lista de enzimas, aditivos alimentares e veículos autorizados em preparações enzimáticas para uso na produção de alimentos em geral**. Órgão emissor: ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/391619/Resolu%25C3%25A7%25C3%25A3o%2BRDC%2Bn.%2B53_2014_Lista%2Bde%2Benzimas.pdf/680b654b-2bab-4571-a498-d77dd1cec8c4>. Acesso em: 12 de agosto de 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Desmistificando dúvidas sobre alimentação e nutrição:** material de apoio para profissionais de saúde / Ministério da Saúde, Universidade Federal de Minas Gerais. – Brasília: Ministério da Saúde, 2016.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Decreto nº 9.013, de 29 de março de 2017. **Diário Oficial da União**, 30 mar. 2017.

CABRAL, J. M. S.; NOVAIS, J. M.; CARDOSO, J. P. Immobilization of amyloglucosidase on alkalyne derivatives of metal-link activated inorganic supports. **Biotechnology Bioengineering**. v. 23, p. 2083-2092, 1981. <https://doi.org/10.1002/bit.260230912>

CABRAL, B. V.; SANTOS, L. D.; FALLEIROS, L. N. S. S.; CARMO, T. S.; FREITAS, F. F.; CARDOSO, S. L.; RESENDE, M. M. de; RIBEIRO, E. J. Sucrose hydrolysis by invertase immobilized on Duolite A-568 employing a packed-bed reactor. **Chemical Engineering Communications**, v. 204, p. 1007 – 1019, 2017. <https://doi.org/10.1080/00986445.2017.1336089>

CAMPOLLO, G. DA S.; TRINDADE, R. A.; RÊGO, T. V.; BURKERT, J. F. DE 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, 2012. <https://doi.org/10.1515/1556-3758.2760>

CARDOSO, C. L.; DE MORAES, M. C.; CASS, Q. B. Imobilização de enzimas em suportes cromatográficos: uma ferramenta na busca por substâncias bioativas. **Química Nova**, v. 32, p.175-187, 2009. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000100033>

Capítulo 5 – Referências Bibliográficas

CAREVIĆ, M.; ČOROVIĆ, M.; MLADEN MIHAILOVIĆ, M.; BANJANAC, K.; MILISAVLJEVIĆ, A.; VELIČKOVIĆ, D.; BEZBRADICA, D. Galacto-oligosaccharide synthesis using chemically modified β -galactosidase from *Aspergillus oryzae* immobilized onto macroporous amino resin. **International Dairy Journal**, v. 54, p. 50-57, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2015.10.002>

CARMINATTI, A. C. **Ensaio de hidrólise enzimática da lactose em reator a membrana utilizando β -galactosidase *Kluyveromices lactis***. 2001. 66f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2001.

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

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. **Perspectivas para a Agropecuária**, Brasília, v.5, p. 1-112, ago. 2017.

COSTA, H. C. B.; ROMÃO, B. B.; RIBEIRO, E. J.; RESENDE, M. M. Glutaraldehyde Effect in the Immobilization Process of Alpha-Galactosidase from *Aspergillus niger* in the Ion Exchange Resin Duolite A-568. **Chemical Engineering Transactions**, v. 32, p. 1105 – 1110, 2013. [DOI: 10.3303/CET1332185](https://doi.org/10.3303/CET1332185)

COUTINHO FILHO U.; RIBEIRO, E. J.; MAUGERI FILHO, F. Estabilidade de invertase imobilizada em sílica. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS, nº 15, 2005, Recife. Anais, 2005.

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

DENG, Y.; WITZ, B. M.; DAI, N.; FOX, M. Lactose Intolerance in Adults: Biological Mechanism and Dietary Management. **Nutrients**, v. 7, p. 8020-8035. 2015. <https://doi.org/10.3390/nu7095380>

DEPETERS, E. J.; CANT, J. Nutritional factors influencing the nitrogen composition of bovine milk: A Review. **Journal Dairy Science**. v. 75, p. 2043-2070. 1992. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(92\)77964-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(92)77964-8)

DUARTE, L.S.; SCHÖFFER, J.D.N.; LORENZONI, A.S.G.; RODRIGUES, R.C.; RODRIGUES, E.; HERTZ, P.F. A new bioprocess for the production of prebiotic lactosucrose by an immobilized β -galactosidase. **Process Biochemistry**, v. 55, p. 96-103, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2017.01.015>

ELNASHAR, M. M.; YASSIN, M. A. Covalent immobilization of β -galactosidase on carrageenan coated with chitosan. **Journal Applied Polymer Science**, v.114 p. 17-24, 2009. <https://doi.org/10.1002/app.30535>

ESCOBAR, S.; ILLANES, A.; WILSON, L.; BERNAL, C.; MESA, M. In situ immobilization of β -galactosidase from *Bacillus circulans* in silica by sol-gel process: Application in prebiotic synthesis. **Engineering in Life Sciences**, v. 16, p. 396-404, 2016. <https://doi.org/10.1002/elsc.201500097>

Capítulo 5 – Referências Bibliográficas

- ESKANDARLOO, H.; ABBASPOURRAD, A. Production of galacto-oligosaccharides from whey permeate using β -galactosidase immobilized on functionalized glass beads. **Food Chemistry**, v. 251, p. 115-124, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.01.068>
- ESTEVINHO, B. N.; DAMAS, A. M.; MARTINS, P.; ROCHA, F. Microencapsulation of β -galactosidase with different biopolymers by a spray-drying process. **Food Research International**, v. 64, p. 134-140, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.05.057>
- EUROMONITOR. **Does Lactose-free dairy have a future?.** Abril 2016. Disponível em: <<http://blog.euromonitor.com/2016/04/does-lactose-free-dairy-have-a-future.html>>. Acesso em: 26 nov. 2017.
- FALLEIROS, L. N. S. S.; CABRAL, B. V.; FISCHER, J.; GUIDINI, C. Z.; CARDOSO, V. L.; RESENDE, M. M. de; 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**, v. 23, p. 495 – 506, 2017. <https://doi.org/10.2298/CICEQ160912010F>
- FAO - Food and Agriculture Organization. **Food Outlook**. 152p. 2017. Disponível em: <<http://www.fao.org/3/a-i7343e.pdf>>. Acesso em: 26 de nov. 2017.
- FARAG, R. S.; AFIFI, M. S.; ABD-RABOW, M. M. Extractive spectrophotometric determination of mianserin hydrochloride by acid-dye complexation method in pure and in pharmaceutical preparations. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 2, n. 5, p. 1197-1203, 2011.
- FERNÁNDEZ, C.M., MARTIN, V.C. Preparation d'un tampon universel de force ionique 0,3 M. *Talanta*. V.24, 747-748. 1977. [https://doi.org/10.1016/0039-9140\(77\)80204-X](https://doi.org/10.1016/0039-9140(77)80204-X)
- FISCHER, J.; GUIDINI, C. Z.; SANTANA, L. N. S.; RESENDE, M. M. de; 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, p. 178-186, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2012.09.008>
- FOX, P.F., UNIACKE-LOWE, T., MCSWEENEY, P.L.H., O'MAHONY, J.A. **Dairy chemistry and biochemistry**. 2. ed. London: Springer International Publishing, 2015. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-14892-2>
- GASPARIN, F. S. R.; TELES, J. M.; ARAÚJO, S.C. Alergia à proteína do leite de vaca versus intolerância à lactose: as diferenças e semelhanças. **Revista Saúde e Pesquisa**. v. 03, n. 01. 2010
- GEKAS, V.; LOPEZ-LEIVA, M. Hydrolysis of lactose: a literature review. **Process Biochemistry**, v. 20, pp 2-12, 1985.
- GONZÁLEZ-CATAÑO, F.; TOVAR-CASTRO, L.; CASTAÑO-TOSTADO, E.; REGALADO-GONZALEZ, C.; GARCÍA-ALMENDAREZ, B.; CARDADOR-MARTÍNEZ, A.; AMAYA-LLANO, S. Improvement of covalent immobilization procedure of β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* for galactooligosaccharides production: Modeling and

Capítulo 5 – Referências Bibliográficas

kinetic study. **Biotechnol Progress**, v. 33, p. 1568-1578, 2017. <https://doi.org/10.1002/btpr.2509>

GREGORIO, P. G. Intolerancia a la lactosa. Una patología emergente, **Sociedad Española de Geriatría y Gerontología**, p. 1-28, 2013.

GUERRERO, C.; VERA, C.; SERNA, N.; ILLANES, A. Immobilization of *Aspergillus oryzae* β -galactosidase in an agarose matrix functionalized by four different methods and application to the synthesis of lactulose. **Bioresource Technology**, v. 232, p. 53-63, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.02.003>

GUIDINI, C. Z. **Imobilização de β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* em Resinas de Troca Iônica**. 2009. 124 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2009.

GUIDINI, C. Z.; FISHER, 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. 5, p. 137-143, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2010.07.013>

GÜRDAŞ, GÜLEÇ A.; MUTLU M. Immobilization of *Aspergillus oryzae* β -galactosidase onto Duolite A568 resin via simple adsorption mechanism. **Food Bioprocess Technology**, v. 5, p. 904-911, 2012. <https://doi.org/10.1007/s11947-010-0384-7>

HOBMAN, P. G. Review of process and products for utilization of lactose in deproteinated milk serum. **Journal of Dairy Science**, n. 67, v. 11, 2630-2653, 1984. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(84\)81624-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(84)81624-0)

HOMAEI, A. A.; SARIRI, R.; VIANELLO, F.; STEVANATO, R. Enzyme immobilization: an update. **Journal of Chemical Biology**, v. 6, p. 185 – 205, 2013. <https://doi.org/10.1007/s12154-013-0102-9>

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Estatística populacional**. 2013. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/estatisticas-novoportal/sociais/populacao/9109-projacao-da-populacao.html?&t=resultados>>. Acesso em: 26 nov. 2017.

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Indicadores IBGE Estatística da Produção Pecuária**, 2018. Disponível em: <https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/2380/epp_2018_3tri.pdf>. Acesso em 03 de jan. 2018.

JESIONOWSKI, T.; ZDARTA, J.; KRAJEWSKA, B. Enzyme immobilization by adsorption: A review. **Adsorption**, v. 20, n. 5–6, p. 801–821, 2014. <https://doi.org/10.1007/s10450-014-9623-y>

JOVANOVIC-MALINOVSKA, R.; FERNANDES, P.; WINKELHAUSEN, E.; FONSECA, L. Galacto-oligosaccharides Synthesis from Lactose and Whey by β -Galactosidase Immobilized in PVA. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 168, p. 1197–1211, 2012. <https://doi.org/10.1007/s12010-012-9850-1>

Capítulo 5 – Referências Bibliográficas

JUAJUN, O., NGUYEN, T., MAISCHBERGER, T., IQBAL, S., HALTRICH, D., YAMABHAI, M. Cloning, purification, and characterization of β -galactosidase from *Bacillus licheniformis* DSM 13. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 89, p. 645–654, 2011. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2862-2>

KENNEDY, J. F.; CABRAL, J. M. S. Enzyme immobilization. In: **Enzyme Technology**. (REHM. H.J. e REED G., EDITORS). V. 7A, P. 347-406, 1987.

KIM, H.; CHOI, N.; OH, S.-W.; KIM, Y.; KIM, B. H.; KIM, I.-H. Synthesis of α -linolenic acid-rich triacylglycerol using a newly prepared immobilized lipase. **Food Chemistry**, v. 237, p. 654-658, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.05.161>

KIM, Y.-S.; LIM, Y.-R.; OH, D.-K. L-Arabinose production from sugar beet arabinan by immobilized endo- and exo-arabinanases from *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* in a packed-bed reactor. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 113, p. 239-241, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2011.10.008>

KOKKILIGADDA, A.; BENIWAL, A.; SAINI, P.; VIJ, S. Utilization of Cheese Whey Using Synergistic Immobilization of β -Galactosidase and *Saccharomyces cerevisiae* Cells in Dual Matrices. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 179, p. 1469–1484, 2016. <https://doi.org/10.1007/s12010-016-2078-8>

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, 2014.

LIMA, A. F.; CAVALCANTE, K.F.; FREITAS, M.D.F.M. DE; 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. **Proc. Biochem.**, v. 48, p. 443-452, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2013.02.002>

LIMSAWAT, P.; PRUKSASRI, S. Separation of lactose from milk by ultrafiltration. **Asian Journal of food and Agro-Industry**. Bangkok, v. 3, p.236-243, 2010.

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

MAHAN, K.; ESCOTT-STUMP, S.; RAYMOND, J. L. **Krause Alimentos, Nutrição e Dietoterapia**. 13 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.

MAIR, C. β -Galactosidase of *Bacillus licheniformis*: **Immobilization on chitin using a chitin binding domain and biochemical characterization**. 2010. 98 f. Department of Food Science and Technology Division of Food Biotechnology - Universität für Bodenkultur Wien, Vienna, 2010.

MARQUEZ, L. D. S. **Produção de açúcar invertido pelo uso de invertase imobilizada em resinas**. 2007. 137 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2007.

Capítulo 5 – Referências Bibliográficas

MATEO, C.; ABIAN, O.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GUISÁN, J. M. Increase in conformational stability of enzymes on epoxy-activated supports by favouring additional multipoint covalent attachment. **Enzyme And Microbial Technology**, v. 26, p. 509-515, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(99\)00188-X](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(99)00188-X)

MATEO, C.; ABIAN, O.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; PEDROCHE, J.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; GUISAN, J. M. Epoxy Sepabeads: A Novel Epoxy Support for Stabilization of Industrial Enzymes via Very Intense Multipoint Covalent Attachment. **Biotechnol Progress**, v. 18, p. 629-634, 2002. <https://doi.org/10.1021/bp010171n>

MATEO, C., PALOMO, J. M., FERNANDEZ-LORENTE, G., GUISAN, J. M., FERNANDEZ-LAFUENTE, 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>

MATHIÚS, L. A., MONTANHOLI, C. H. dos S., OLIVEIRA, L. C. N de., BERNARDES, D. N. D., PIRES, A., HERNANDEZ, F. M. de O. Aspectos atuais da intolerância à lactose. **Revista Odontológica de Araçatuba**, v.37, n.1, p. 46-52, Janeiro/Abril, 2016

MATTAR, R.; MAZO, D. F.de C. Intolerância à Lactose: mudança de paradigmas com a biologia molecular. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v. 56, n. 2, p. 230-236, 2010. <https://doi.org/10.1590/S0104-42302010000200025>

MENDES, A. A.; CASTRO, H. F. DE.; RODRIGUES, D. DE S.; ADRIANO, W. S.; TARDIOLI, P. W.; MAMMARELLA, E. J.; GIORDANO, R. DE C.; GIORDANO, R. DE L. C. Multipoint covalent immobilization of lipase on chitosan hybrid hydrogels: influence of the polyelectrolyte complex type and chemical modification on the catalytic properties of the biocatalysts. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 38, n. 8, p. 1055 – 66, 2011. <https://doi.org/10.1007/s10295-010-0880-9>

MENDES, A. A.; DE CASTRO, H. F.; GIORDANO, R. DE L. C. Triagem de suportes orgânicos e protocolos de ativação na imobilização e estabilização de lipase de *Thermomyces lanuginosus*. **Química Nova**, v. 36, n. 2, p. 245–251, 2013. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422013000200008>

MEPHAN, T. B., GAYE, P., MARTIN, P., MERCIER, J.C. Biosynthesis of milk protein. In: Fox, P.F. (Ed.). **Advanced dairy chemistry – Proteins**. London, Elsevier Applied Science, v.1, 457-491 p. 1992.

MESSING, R. A. **Immobilized Enzymes for Industrial Reactors**. New York: Academic Press, 1975.

MESSING, R. A. Carriers for immobilized biologcall active systems in advances in biochemical engineering. **Immobilized Enzymes I**. v. 10, 1978.

MIHAILOVIĆ, M.; STOJANOVIĆ, M.; BANJANAC, K.; CAREVIĆ, M.; PRLAINOVIĆ, N.; MILOSAVIĆ, N.; BEZBRADICA, D. Immobilization of lipase on epoxy-activated Purolite® A109 and its post-immobilization stabilization, **Process Biochemistry**, v. 49, p. 637-646, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2014.01.013>

Capítulo 5 – Referências Bibliográficas

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

MOHAMAD, N.; BUANGA, N. A.; MAHAT, N. A.; JAMALIS, J.; HUYOP, F.; ABOUL-ENEINC, H. Y.; WAHABA, R. A. Simple adsorption of *Candida rugosa* lipase onto multi-walled carbon nanotubes for sustainable production of the flavor ester geranyl propionate. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 32, p. 99 – 108, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2015.08.001>

MOHY ELDIN, M. S.; ELAASSAR, M. R.; ELZATAHRY, A. A.; AL-SABAH, M. M.; HASSAN, E. A. Covalent immobilization of β -galactosidase onto amino-functionalized PVC microspheres. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 125, p. 1724-1735, 2012. <https://doi.org/10.1002/app.35682>

MONIER, M. Immobilization of β -galactosidase from *Escherichia coli* onto modified natural silk fibers. **Journal Applied Polymer Science**, v. 130, p. 2923-2931, 2013. <https://doi.org/10.1002/app.39475>

NELSON, J. M.; GRIFFIN, E. G. Adsorption of invertase. **Journal of the American Chemical Society**. v 38, p1109-1115, 1916. <https://doi.org/10.1021/ja02262a018>

NGUYEN, V.D.; STYEVKÓ, G.; TA, L.P.; TRAN, A. T. M.; BUJNA, E.; ORBÁN, P.; DAM, M.S.; NGUYEN, Q. D. Immobilization and some properties of commercial enzyme preparation for production of lactulose-based oligosaccharides. **Food and Bioproducts Processing**, v. 107, p. 97-103, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2017.11.004>

OBÓN, J. M.; CASTELLAR, M. R.; IBORRA, J. L.; MANJÓN, A. β -galactosidase Immobilization for Milk Lactose Hydrolysis: A sample experimental and Modeling Study of Batch and Continuous Reactors. **Biochemical Education**, v. 28, n. 3, p. 164-168. 2000. [https://doi.org/10.1016/S0307-4412\(99\)00097-7](https://doi.org/10.1016/S0307-4412(99)00097-7)

OLIVEIRA, L. M. de. **Purificação da cefamicina C por processo de adsorção em coluna de leito fixo.** 2013. 110 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Pós-graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos. 2013.

ORDÓÑEZ, J. A. **Tecnologia de Alimentos:** Alimentos de origem animal. v.2. Porto Alegre: Artmed, 2005.

PARIZZI, P. C., **Imobilização de Beta-galactosidase em criogel supermacroporoso para hidrólise de lactose.** 2015. 56 f. Dissertação (Mestrado) - Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2015.

PARK, C.-S., KWON, H.-J., YEOM, S.-J., & OH, D.-K. Mannose production from fructose by free and immobilized d-lyxose isomerasases from *Providencia stuartii*. **Biotechnology Letters**, v. 32, p. 1305 - 1309, 2010. <https://doi.org/10.1007/s10529-010-0300-2>

PEREIRA, M. C. S.; BRUMANO, L. P.; KAMIYAMA, C. M.; PEREIRA, J. P. F.; RODARTE, M. P.; PINTO, M. A. DE O. Lácteos com baixo teor de lactose: uma necessidade para portadores de má digestão da lactose e um nicho de mercado. **Revista do Instituto de**

Capítulo 5 – Referências Bibliográficas

Laticínios Cândido Tostes, Juiz de Fora, v. 67, n. 389, p. 57-65, nov./dez. 2012. <https://doi.org/10.5935/2238-6416.20120079>

PESSELA, B. C. C.; BETANCOR, L.; LOPEZ-GALLEGO, F.; TORRES, R.; DELLAMORA-ORTIZ, G. M.; ALONSO-MORALES, N.; FUENTES, M.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; GUISÁN, J. M.; MATEO, C. Increasing the binding strength of proteins to PEI coated supports by immobilizing at high ionic strength. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 37, p. 295-299, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.04.021>

RATHORE, S.; DESAI, P. M.; LIEW, C. V.; CHAN, L. W.; HENG, P. W. S. Review – Microencapsulation of microbial cells. **Journal of Food Engineering**, v. 116, n. 2, p. 369 – 381, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2012.12.022>

RENHE, I. R. T.; PERRONE, I. T.; SILVA, P. H. F. da. **Leite Condensado. Identidade, qualidade e tecnologia**, Juiz de Fora: Templo, 2011.

RESENDE, R. R.; SOCCOL, C. R.; FRANÇA, L. R. **Biotecnologia aplicada à agro indústria: fundamentos e aplicações**. São Paulo: Blucher, 2016, 1069 p.

RIBEIRO, E. J. **Estudo cinético da hidrólise de sacarose por invertase livre e imobilizada**. 1989. 213 f. (Tese de Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1989.

RICARDI, N. C.; MENEZES, E. W. de; BENVENUTTI, E. V.; SCHÖFFER, J. da N. HACKENHAAR, C. R.; HERTZ, P. F.; COSTA, T. M. H. Highly stable novel silica/chitosan support for β -galactosidase immobilization for application in dairy technology. **Food Chemistry**, v. 246, p. 343-350, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.11.026>

ROCHA, J. R.; CATANA, R.; FERREIRA, B. S.; CABRAL, J.M.S.; FERNANDES, P. Desing and characterisation of an enzyme system for inulin hidrolysis. **Food Chemistry**. v. 95, n. 1, p.77-82, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.12.020>

ROCHA, F. L.; ROEPCKE, C. B. S. Lactase para iogurte. **Granonews**, Curitiba, n. 104, p. 6-7, 2015. Disponível em: http://granotec.com.br/wp-content/uploads/2017/08/granonews_104_v09.pdf. Acesso em: 04 dez. 2017.

RODRÍGUEZ-COLINAS, B.; FERNANDEZ-ARROJO, L.; SANTOS-MORIANO, P.; BALLESTEROS, A.; PLOU, F. Continuous Packed Bed Reactor with Immobilized β -Galactosidase for Production of Galactooligosaccharides (GOS). **Catalysts**, v.6. p. 189, 2016. <https://doi.org/10.3390/catal6120189>

RODRIGUES, R. C.; ORTIZ, C.; BERENGUER-MURCIA, A.; TORRES, R.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Modifying enzyme activity and selectivity by immobilization **Chem. Soc. Rev.**, v. 42, p. 6290-6307, 2013. <https://doi.org/10.1039/C2CS35231A>

ROSA, N. P.; RÉVILLION, J. P. P. Fatores estratégicos explorados pelas empresas processadoras de lácteos para inserir-se no mercado de bebidas à base de soja. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 6, p. 1108-1113, 2011. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782011000600030>

Capítulo 5 – Referências Bibliográficas

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

SANTOS, B. L. dos. Imobilização de lipase por diferentes técnicas para obtenção de catalisadores estáveis. 2014. 90 f. (Dissertação de Mestrado em Biologia Geral e Aplicada) – Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2014.

SATO, N. Cresce lançamento de produtos sem lactose no brasil. **Mintel**, 2016. Disponível em: <<http://brasil.mintel.com/blog/noticias-mercado-alimentos-bebidas/cresce-lancamento-de-produtos-sem-lactose-no-brasil>>. Acesso em: 04 dez. 2017.

SATYAWALI, Y.; VAN ROY, S.; ROEVENS, A.; MEYNEN, V.; MULLENS, S.; JOCHEMS, P.; DOYEN, W.; CAUWENBERGHS, L.; DEJONGHE, W. Characterization and analysis of the adsorption immobilization mechanism of β -galactosidase on metal oxide powders. **RSC Advances**, v. 3, p. 24054-24062, 2013. <https://doi.org/10.1039/c3ra45107k>

SEN, S.; RAY, L.; CHATTOPADHYAY, P. Production, Purification, Immobilization, and Characterization of a Thermostable β -Galactosidase from *Aspergillus alliaceus*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 167, p. 1938 – 1953, 2012. <https://doi.org/10.1007/s12010-012-9732-6>

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. β -galactosidase technology: a solution to the lactose problem. **Critical Reviews Food Technology**. 5: 325-356, 1975. <https://doi.org/10.1080/10408397509527178>

SILVA, N. C. A.; MIRANDA, J. S.; BOLINA, I. C. A.; SILVA, W. C.; HIRATA, D. B.; CASTRO, H. F. DE; MENDES, A. A. Immobilization of porcine pancreatic lipase on poly-hydroxybutyrate particles for the production of ethyl esters from macaw palm oils and pineapple flavor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 82, p. 139–149, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2013.11.015>

SIMILI, F. F.; LIMA, M. L. P. Como os alimentos podem afetar a composição do leite das vacas. **Pesquisa & Tecnologia**, São Paulo, v. 1, n. 4, p.1-13, 2007. Semestral. Disponível em: <<http://www.aptaregional.sp.gov.br/acesse-os-artigos-pesquisa-e-tecnologia/edicao-2007/2007-janeiro-junho/514-como-os-alimentos-podem-afetar-a-composicao-do-leite-das-vacas/file.html>>. Acesso em: 26 de novembro de 2017.

SINGH, R. S.; DHALIWAL, R.; PURI, M. Production of high fructose syrup from Asparagus inulin using immobilized exoinulinase from *Kluyveromyces marxianus* YS-1. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 34, p. 649 – 655, 2007. <https://doi.org/10.1007/s10295-007-0237-1>

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**, v. 79, p. 179-211, 2016. <https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2016.07.004>

Capítulo 5 – Referências Bibliográficas

SOUSA, A. S. de. **Leite: Importância, síntese e manipulação da composição.** 2015. Dissertação (Mestrado). Curso de Pós-graduação Profissionalizante em Zootecnia, Universidade Federal de Viçosa.

SOUSA, C. C. **Síntese e imobilização em resina de troca iônica de beta-galactosidase de *Kluyveromyces marxianus*.** Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, 143 p., 2018.

SZCZODRAK, J. Hydrolysis of Lactose in Whey Permeate by Immobilized β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, v.10, n.6, p.631-637. 2000. [https://doi.org/10.1016/S1381-1177\(00\)00187-9](https://doi.org/10.1016/S1381-1177(00)00187-9)

TOLEDO, E. C. V. de. **Modelagem, simulação e controle de reatores catalíticos de leito fixo.** 1999. Tese (Doutorado em Engenharia Química). Curso de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas.

TORRES, P.; BATISTA-VIERA, F. Immobilization of β -galactosidase from *Bacillus circulans* onto epoxy-activated acrylic supports. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 74, p. 230-235, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2011.11.006>

TRAN, D. N.; BALKUS, K. J. Topics Enzyme Immobilization via Electrospinning. In **Catalysis**, v.55, p.1057-1069, 2012.

UGIDOS-RODRÍGUEZ, S.;MATALLANA-GONZÁLEZ, M. C.; SÁNCHEZ-MATA, M. C. Lactose malabsorption and intolerance: a review. **Food & Function**, v. 9, p. 4056-4068, 2018. <https://doi.org/10.1039/C8FO00555A>

URRUTIA, P.; BERNAL, C.; WILSON, L.; ILLANES, A. Use of chitosan heterofunctionality for enzyme immobilization: β -galactosidase immobilization for galacto-oligosaccharide synthesis. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 116, p. 182-193, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.04.112>

USME, P.; JARAMILLO, D. M.; ÁLVAREZ, F. **Microencapsulación de la lactasa como estrategia para mejorar la estabilidad y la aplicación en la industria de los alimentos.** 2013. 36 p. Especialización em Alimentación y Nutrición (Corporación Universitaria Lasallista) - Facultad de Ingeniería. Caldas, Antioquia, 2013.

VERMA, M. L.; BARROW, C. J.; KENNEDY, J. F.; PURI, M. Immobilization of β -d-galactosidase from *Kluyveromyces lactis* on functionalized silicon dioxide nanoparticles: Characterization and lactose hydrolysis. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 50, p. 432-437, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2011.12.029>

VIEIRA, D. C. **Imobilização de enzima β -galactosidase de *Kluyveromyces fragilis* em agarose e quitosana utilizando diferentes protocolos de ativação.** 2009. 96f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2009.

ZACARCHENCO, P. B.; VAN DENDER, A. G. F.; REGO, R. A. **Brasil dairy trends 2020.** 1. ed. Campinas: ITAL, 2017

Capítulo 5 – Referências Bibliográficas

ZADOW, J. G. Lactose – Properties and Uses. **Journal of Dairy Science**, v. 67, n. 11, p. 2654-2679. 1984. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(84\)81625-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(84)81625-2)

ZHANG, Z.; ZHANG, R.; CHEN, L.; MCCLEMENTS, D. J. Encapsulation of lactase (β -galactosidase) into κ -carrageenan-based hydrogel beads: Impact of environmental conditions on enzyme activity. **Food Chemistry**, v. 200, p. 69-75, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.01.014>

ZOCCAL, R. **Alguns números do leite**. 2016. Disponível em: <<http://www.baldebranco.com.br/alguns-numeros-do-leite/>>. Acesso em: 26 de nov. 2017.

WAHBA, M. I.; HASSAN, M. E. Novel grafted agar disks for the covalent immobilization of β -D-galactosidase. **Biopolymers**, v. 103, p. 675-684, 2015. <https://doi.org/10.1002/bip.22693>

WALLENFELS, K.; MALHOTRA, O. P. Galactosidases. **Advances in Carbohydrate Chemistry**, New York, v. 16, p. 239-298, 1962. [https://doi.org/10.1016/S0096-5332\(08\)60264-7](https://doi.org/10.1016/S0096-5332(08)60264-7)