



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Faculdade de Engenharia Química
Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos



REJANE DE OLIVEIRA RAMOS

**AVALIAÇÃO DE ESTRATÉGIAS DE IMOBILIZAÇÃO E ESTABILIZAÇÃO
DE B-GALACTOSIDASE DE *Bacillus licheniformis***

PATOS DE MINAS

2022

REJANE DE OLIVEIRA RAMOS

**AVALIAÇÃO DE ESTRATÉGIAS DE IMOBILIZAÇÃO E ESTABILIZAÇÃO
DE B-GALACTOSIDASE DE *Bacillus licheniformis***

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.

Orientadora: Prof. Dra. Carla Zanella Guidini

Coorientadora: Prof. Dra. Larissa Nayhara S. S. Falleiros

PATOS DE MINAS

2022

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

R175
2022

Ramos, Rejane de Oliveira, 1972-
Avaliação de estratégias de imobilização e
estabilização de beta-galactosidase de *Bacillus*
licheniformis [recurso eletrônico] / Rejane de Oliveira
Ramos. - 2022.

Orientadora: Carla Zanella Guidini.

Coorientadora: Larissa Nayhara Soares Santana
Falleiros.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de
Uberlândia, Pós-graduação em Engenharia de Alimentos.

Modo de acesso: Internet.

Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.di.2022.91>

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

1. Alimentos - Indústria. I. Guidini, Carla Zanella,
1983-, (Orient.). II. Falleiros, Larissa Nayhara Soares
Santana, 1988-, (Coorient.). III. Universidade Federal
de Uberlândia. Pós-graduação em Engenharia de Alimentos.
IV. Título.

CDU: 664

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:

Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Engenharia de Alimentos				
Defesa de:	Dissertação de Mestrado Acadêmico n. 1/2022 - PPGEA				
Data:	Vinte e dois de fevereiro de dois mil e vinte e dois	Hora de início:	14:00	Hora de encerramento:	15:45
Matrícula do Discente:	41912EAL012				
Nome do Discente:	Rejane de Oliveira Ramos				
Título do Trabalho:	Avaliação de estratégias de imobilização e estabilização de β -galactosidase de <i>Bacillus licheniformis</i>				
Área de concentração:	Engenharia de Alimentos				
Linha de pesquisa:	Processos Biotecnológicos				

Reúne-se por webconferência (RNP - MConf) a Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos, assim composta: Carla Zanella Guidini (Presidente - FEQUI/UFU), Janaína Fischer (UPF) e Liliane Maciel de Oliveira (UFSJ).

Iniciando os trabalhos a presidente da mesa apresentou a Comissão Examinadora e a discente, agradeceu a participação do público, e concedeu à discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação da mesma 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 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. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme será assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Carla Zanella Guidini, Presidente**, em 22/02/2022, às 15:45, 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 22/02/2022, às 15:45, 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 **Liliane Maciel de Oliveira, Usuário Externo**, em 22/02/2022, às 15:45, 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 **3390991** e o código CRC **A0B7712B**.

*“Ora, a fé é o firme fundamento das coisas que se esperam,
e a prova das coisas que não se vêem.”*

(Hebreus 11:1) Bíblia Sagrada

AGRADECIMENTOS

Acima de todas as coisas agradeço ao meu DEUS por ter me dado fé e força, animo determinação e em me guiar para chegar até aqui, foram dias de muita luta, dedicação e graças a DEUS consegui vencer mais esse desafio e glórias a DEUS a batalha foi ganha.

Minha gratidão ao meu esposo Acrísio Ramos que sempre me apoiou e me ajudou nesta conquista e esteve ao meu lado, aos meus filhos Thais, Thatiane, Thiago e meu netinho khauã sempre me incentivando a continuar e prosseguir.

Aos meus familiares meus irmãos e minha mãe querida Natérci meu grande exemplo, pelas lições e ensinamentos de sempre e por todas suas orações.

A minha orientadora Dra. Carla Zanella Guidini e coorientadora Dra. Larissa Nayhara S. S. Falleiros pela paciência suas orientações, pelo carinho, apoio, atenção e disponibilidade em todas as etapas desse trabalho, tenho um carinho e admiração enorme por vocês, minha imensa gratidão, pois cresci nos meus conhecimentos aprendi muito e vocês fazem parte dessa conquista.

A professora Janaína e Liliane por aceitarem o convite nesta avaliação e pelas contribuições e sugestões dadas Deus vos abençoe.

Não poderia esquecer de agradecer a grande ajuda de minhas amigas Lilian e Vitória no entendimento dos experimentos foi difícil glórias a DEUS deu certo. Aos colegas de sala de aula que foram grandes companheiros e companheiras Pamela, Jaqueline, irmã Carla vocês são especiais para mim.

A coordenadoria do PPGEA e a minha irmã em Cristo Samira sempre me instruindo nas demandas do curso e incentivando. Aos demais professores que ajudaram como Prof. Dr. Ricardo Corrêa de Santana pelas explicações e atenção a mim concedidas, aos Técnicos do Laboratório, enfim foram várias as pessoas que fizeram parte de minha jornada e que colaboraram e mesmo que não cite o nome de todos gostaria de deixar meu muito obrigada e que o Senhor DEUS possa recompensá-los. Amém.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	iii
LISTA DE FIGURAS	iv
RESUMO	v
ABSTRAT	vi
CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO	1
CAPÍTULO 2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 INTRODUÇÃO	3
2.1 Enzimas.....	3
2.1.2 Enzimas industriais	4
2.2 ENZIMA B-GALACTOSIDASE	6
2.3 IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS	11
2.3.1 Métodos de imobilização	12
2.3.1.1 Métodos químicos.....	13
2.3.1.1.1 Imobilização por ligação covalente	13
2.3.1.1.2 Imobilização por reticulação.....	16
2.3.1.2 Métodos físicos	19
2.3.1.2.1 Encapsulação/Aprisionamento.....	19
2.3.1.2.2 Adsorção física	22
2.4 EQUILÍBRIO DE ADSORÇÃO	26
2.5 SUPORTES DE IMOBILIZAÇÃO	29
2.5.1 Nanomateriais	30
2.5.1.1 Nanomateriais inorgânicos	32
2.5.1.2 Nanomateriais orgânicos	34
2.5.1.3 Nanomateriais híbridos	35
2.6 REATORES UTILIZADOS	39
2.7 ESTABILIDADE DA ENZIMA IMOBILIZADA	42
2.7.1 pH, força iônica, temperatura e aditivos nas imobilizações	43
2.7.1.1 Efeito do pH.....	43
2.7.1.2 Efeito da força iônica	44
2.7.1.3 Efeito da temperatura.....	45
2.7.1.4 Efeitos de aditivos.....	46
2.8 APLICAÇÃO DA ENZIMA B-GALACTOSIDASE IMOBILIZADA	46

2.9 CONSIDERAÇÕES FINAIS E TENDENCIAS FUTURAS	49
REFERÊNCIAS	50
CAPÍTULO 3 – AVALIAÇÃO DE ESTRATÉGIAS DE IMOBILIZAÇÃO E ESTABILIZAÇÃO DE B-GALACTOSIDASE DE <i>Bacillus licheniformis</i>	78
3.1 INTRODUÇÃO	78
3.2 MATERIAL E MÉTODOS	80
3.2.1 Enzima β -galactosidase de <i>Bacillus licheniformis</i>	80
3.2.2 Resina Duolite A 568.....	81
3.2.3 Imobilização da β -galactosidase	82
3.2.4 Influência do pH e de elevadas concentrações da solução de tampão Britton Robinson (BR) na imobilização	82
3.2.5 Influência conjunta da concentração da solução do tampão BR e do tempo de imobilização na atividade da enzima imobilizada	83
3.2.5.1 Determinação da atividade enzimática	83
3.3 RESULTADO E DISCUSSÃO	85
3.3.1 Efeito de elevadas concentrações da solução do tampão BR na imobilização	85
3.3.2 Influência conjunta da concentração de tampão BR e do tempo na imobilização	90
3.3.3 Análise do processo de imobilização pelas respostas rendimento, eficiência e recuperação da imobilização	95
3.4 CONCLUSÕES	101
3.4.1 Sugestões para trabalhos futuros	102
REFERÊNCIAS	103

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 – Enzimas livres (solúvel) ou imobilizadas utilizadas industrialmente	5
Tabela 2.2 – Propriedades dos dissacarídeos nome comum, doçura, configuração e solubilidade a 30°C.....	8
Tabela 2.3 – Estratégias de imobilização covalente para β -galactosidase de diferentes fontes.....	14
Tabela 2.4 – Reticulação com β -galactosidase de diferentes fontes e método de reticulação.....	18
Tabela 2.5 – Imobilizações de β -galactosidase de diferentes fontes por aprisionamento/encapsulação.....	20
Tabela 2.6 – β -galactosidase de diversas fontes imobilizada pelo método de adsorção física.....	23
Tabela 2.7 – Alguns modelos de equilíbrio de adsorção como de Langmuir, Freundlich, Dubinin-Radushkevich (D-R) e Temkin.....	27
Tabela 2.8 – β -galactosidase imobilizada em nanomateriais de diferentes fontes.....	37
Tabela 3.1 – Matriz do Planejamento Composto Central Rotacional do efeito da força iônica e Tempo da solução de imobilização.....	83
Tabela 3.2 – Resultados da atividade enzimática em diferentes concentrações de tampão BR em diferentes condições de pH utilizados na imobilização.....	86
Tabela 3.3 – Matriz do PCCR com valores reais e codificados do efeito da força iônica e tempo e na resposta dependente de atividade enzimática.....	91
Tabela 3.4 – Valores reais e codificados do efeito da força iônica e tempo e as respostas dependentes do rendimento, eficiência e recuperação.....	95
Tabela 3.5 – Valores acima de 80% das melhores condições dos parâmetros de rendimento, eficiência e recuperação.....	99

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 – Diferentes aplicações da enzima β -galactosidase.....	7
Figura 2.2 – Atividades hidrolítica e de transgalactosilação por β -galactosidases.....	8
Figura 2.3 – Métodos de imobilização enzimática ligação em suportes, retenção física e ligação cruzada.....	12
Figura 2.4 – Pesquisas relacionadas a β -galactosidase usadas no artigo nos últimos 6 anos (2015-2021), para os métodos de adsorção física, aprisionamento/encapsulamento, ligação covalente e reticulação (CLEA).....	26
Figura 2.5 – Nanomateriais de carbono, folha de grafeno, nanotubos de parede única e dupla utilizados em imobilização enzimática.	31
Figura 3.1 – Aspecto da resina Duolite A 568.....	81
Figura 3.2 – Unidade experimental: reação enzimática de hidrólise de lactose por β -galactosidase (<i>B. licheniformis</i>).....	84
Figura 3.3 – Fluxograma da imobilização enzimática de β -galactosidase	84
Figura 3.4 – Aglomerado (grânulos interligados) formado no	89
Figura 3.5 – Superfície de resposta da influência de força iônica e do tempo na atividade da enzima imobilizada.....	92
Figura 3.6 – Gráfico de superfície de resposta para os valores obtidos no parâmetro de rendimento.	97
Figura 3.7 – Gráfico de superfície de resposta para os valores obtidos no parâmetro de eficiência.....	97
Figura 3.8 – Gráfico de superfície de resposta para os valores obtidos no parâmetro de recuperação.	97

RESUMO

A indústria de laticínios tem participação expressiva no setor de alimentos, tendo a produção de produtos lácteos com teor de lactose reduzido pela enzima β -galactosidase, com crescente demanda. O custo destes produtos sem lactose é maior do que produtos lácteos com lactose devido a etapa de hidrólise enzimática empregando enzimas solúveis, assim o uso da β -galactosidase imobilizada surge como alternativa face ao alto custo de enzimas em sua forma livre. As pesquisas são continuamente direcionadas para se aperfeiçoar o biocatalisador, utilizando suportes e condições que viabilizem e melhorem o processo final. No primeiro momento da pesquisa foi realizado um estudo exploratório do efeito causado pela força iônica e pH no processo de imobilização por adsorção física em suporte Duolite A 568. Empregou-se elevadas concentrações da solução tampão Britton-Robinson (BR) de 300 mM a 1000 mM variando o pH entre 3,5 a 4,5 mantendo o tempo de imobilização em 2 horas. Durante os experimentos foi observado o surgimento inesperado de aglomerados (grânulos) enzimáticos, aos quais verificou-se relevante atividade enzimática de 719 (U) em pH 4,0 (300 mM), 767 U em pH 4,5 (300 mM) e 348 U em pH 4,0 (500 mM), com indicativo de possível imobilização livre de suporte. Para as condições de alta molaridade de tampão (1000 mM), os resultados não demonstraram melhora na atividade da enzima imobilizada. Na seqüência avaliou-se a influência conjunta da força iônica e tempo de imobilização em um planejamento composto central rotacional (PCCR) juntamente com a análise do processo de imobilização pelas respostas de rendimento, eficiência e recuperação. Na atividade hidrolítica da enzima β -galactosidase os melhores resultados foram entre 396 U a 470 U, que se concentraram em tempos curtos ou longos associados a condições de baixa força iônica, evidenciando o efeito de interação nas faixas estudadas entre a concentração do tampão BR (5,12 a 99,88) e tempo (0,46 a 6,12 horas). Nos parâmetros do efeito da análise do desempenho da imobilização em observação a maior atividade da enzima de 470 U em condições de 86 mM em 5,3h uma das melhores regiões obteve-se 91,01 de rendimento, 96,71 de eficiência e 88,01 de recuperação demonstrando ser uma boa abordagem de aprofundamento em novas pesquisas. Esta pesquisa demonstrou que a concentração da força iônica do tampão com tempos definidos e pH da composição do meio são parâmetros importantes que afetam o sítio ativo catalítico da enzima em sua estabilidade, podendo beneficiar ou inibir a atividade da enzima imobilizada.

PALAVRAS-CHAVE: Adsorção física, Tampão Britton-Robinson, β -galactosidase, *Bacillus licheniformis*, Duolite A-568, Força iônica, Troca iônica

ABSTRACT

The dairy industry has expressive participation in the food sector, with the production of dairy products with lactose content reduced by the enzyme β -galactosidase, in increasing demand. Lactose-free products have a higher production cost than dairy products with lactose due to the enzymatic hydrolysis step using soluble enzymes, so the use of immobilized β -galactosidase emerge as an alternative to the high cost of enzymes in their free form. Researches are continuously directed to improve the biocatalyst, using supports and conditions that make the final process feasible and improved. At the first moment in the research, an exploratory study was carried out on the effect caused by ionic strength and pH in the process of immobilization by physical adsorption on Duolite A 568 support. High concentrations of the Britton-Robinson (BR) buffer solution were used, from 300 mM to 1000 mM, varying the pH between 3.5 to 4.5, keeping the immobilization time at 2 hours. During the experiments, the unexpected appearance of enzymatic clusters (granules) was observed, which showed relevant enzymatic activity of 719 (U) at pH 4.0 (300 mM), 767 U at pH 4.5 (300 mM) and 348 U at pH 4.0 (500 mM), indicating possible support-free immobilization. For high buffer molarity conditions (1000 mM), the results showed no improvement in the activity of the immobilized enzyme. In sequence, the joint influence of ionic strength and immobilization time in a central rotational composite design (PCCR) was evaluated together with the analysis of the immobilization process by the yield, efficiency and recovery responses. For the hydrolytic activity of the β -galactosidase enzyme, the best results were between 396 U to 470 U, which were concentrated in short or long periods associated with low ionic strength conditions, evidencing the interaction effect in the studied ranges between the BR buffer concentration (5.12 to 99.88) and time (0.46 to 6.12 hours). In the parameters of the effect of the analysis of the immobilization performance in observation the highest activity of the enzyme of 470 U under conditions of 86 mM in 5.3h one of the best regions was obtained 91.01 of yield, 96.71 of efficiency and 88, 01 recovery proving to be a good approach to deepening in new research. This research demonstrated that the concentration of the ionic strength of the buffer with defined times and pH of the composition of the medium are important parameters that affect the catalytic active site of the enzyme in its stability, which can benefit or inhibit the activity of the immobilized enzyme.

KEYWORDS: Physical adsorption. Britton-Robinson buffer. β -galactosidase. *Bacillus licheniformis*. Duolite A-568. Ionic strength. Ion exchange.

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO

O leite é um dos principais alimentos para o consumo humano e a lactose é o principal carboidrato nele presente. A indústria de laticínios tem participação importante no setor de alimentos, em que diferentes ingredientes, aditivos e tecnologias são necessários para produzir uma variedade de produtos lácteos utilizando como matéria-prima o leite (NAZIR et al., 2021; LEITE et al., 2021; PAIVA et al., 2018).

O leite humano contém aproximadamente 7% de lactose em peso, que está entre as mais altas concentrações de lactose de todos os leites de mamíferos e o leite de vaca contém 4 ou 5% de lactose (HERTZLER et al., 2017). No entanto, na produção de produtos lácteos este teor de lactose pode variar contendo pouca ou nenhuma lactose (CHURAKOVA et al., 2019; PORTNOY et al., 2021).

Em laticínios, nos alimentos com baixa atividade de água como leite condensado, doce de leite e sorvete, o teor reduzido de lactose previne a cristalização da lactose, evitando o aparecimento de uma textura arenosa, devido a uma maior solubilidade da glicose e galactose em relação à lactose (WOLF et al., 2018; VERA et al., 2020). Para muitos queijos duros e envelhecidos, o teor de lactose só é reduzido devido à ação das bactérias do ácido láctico durante o tempo de amadurecimento (cura), como o queijo parmesão possui traços de lactose, cheddar (< 0,1%) ou suíço tendo concentração de lactose muito baixa (DEKKER et al., 2019).

Nos tempos atuais já existem no mercado vários produtos lácteos fabricados que são denominados como “lactose reduzida” ou produtos “sem lactose”, recebendo tal rotulagem que varia de um país para outro. No Brasil, o leite sem lactose supera vendas de US\$ 300 milhões e US\$ 2 per capita anuais, mantendo elevada taxa de crescimento anual estimada entre 5,5% e 15% para os próximos cinco anos (YANG et al., 2021).

A produção de leite com reduzido teor de lactose, ou considerado zero lactose, pode ser feita a partir da hidrólise da lactose, utilizando a enzima β -galactosidase. Relatado por Kuribayashi et al.(2021), a β -galactosidase advinda de *Bacillus licheniformis* em sua forma livre possui boa atividade em temperaturas entre 45°C e 50°C e pH entre 6,0 e 7,0, condições de aplicação ideais para o leite.

O uso da β -galactosidase em sua forma livre (solúvel) é utilizado industrialmente, porém nestes processos industriais a dificuldade de se utilizar de enzimas livres é devido ao alto custo e a sua estabilidade, desta forma, como alternativa eficiente surgem as enzimas imobilizadas, que podem ser reutilizadas diversas vezes, o que diminuiria o custo de produção (SILVA et al., 2019).

No processo de imobilização, as enzimas sofrem retenção física ou ligação química, e se tornam insolúveis após a imobilização, o que facilita muito a recuperação e a reutilização da enzima e maior produtividade que permite processos contínuos e causam contaminação limitada do produto (SIGURDARDÓTTIR et al., 2018; GAN et al., 2021).

Um grande número de diferentes materiais de suporte inorgânicos, orgânicos e recentemente os nanomateriais com morfologias diferenciadas têm sido sugeridos para a imobilização de enzimas (SIGURDARDÓTTIR et al., 2018).

O suporte Duolite A 568 é uma resina aniônica de base fraca, altamente porosa com partículas de tamanho 150–600 μm . Dentre as características desse suporte inclui a superfície ativa adequada para adsorção de enzimas, podendo fornecer rendimentos de imobilização significativos com uma grande carga de enzima adsorvida na superfície de resina por meio de atrações eletrostáticas entre os grupos de amina terciária da resina e ácido carboxílico dos grupos da enzima, através de forças hidrofóbicas e de Van der Waals (WANG et al., 2016).

Assim, o presente trabalho teve o objetivo de investigar e avaliar a influência do processo de imobilização da β -galactosidase *Bacillus licheniformis* pelo método de adsorção física em suporte Duolite A 568 (resina fenol-formaldeído) utilizando concentrações de tampão BR (Britton Robinson) combinado a variações de tempo com pH fixado.

Objetivos específicos

- Artigo de revisão relacionado a enzima β -galactosidase, métodos de imobilização e diversos suportes orgânicos, inorgânicos e nanomateriais, incluindo reatores usados, equilíbrio de adsorção, suportes de imobilização, estabilidade ao uso de enzimas tais como pH, força iônica, temperatura e aditivos e por fim aplicações recentes da enzima β -galactosidase;
- Explorar o uso de elevadas concentrações iônicas de tampão BR (Britton - Robinson) e diferentes pH para obtenção de β -galactosidase imobilizada;
- Avaliar a influência conjunta da concentração do tampão e tempo empregados no processo de imobilização na atividade do biocatalisador imobilizado;
- Analisar o efeito da concentração do tampão e tempo de imobilização nos parâmetros rendimento, eficiência e recuperação da enzima imobilizada.

O trabalho foi estruturado no formato de artigos, sendo o Capítulo 2 referente a uma revisão bibliográfica e o Capítulo 3 relativos à parte experimental.

CAPÍTULO 2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Para a seleção dos artigos relevantes nos últimos 10 anos para o desenvolvimento do trabalho, foram utilizadas as seguintes bases de dados: periódicos capes, *Scielo*, *Scopus* e *Science Direct*. Essas bases de dados permitiram que a pesquisa fosse desenvolvida de forma confiável e segura, além de apresentar maior consistência e disponibilidade de acesso ao material publicado. As palavras chaves utilizadas foram: β -galactosidase, adsorção física, métodos de imobilização, enzimas industriais, reatores, enzimas utilizadas industrialmente, aplicações da β -galactosidase, suportes, nanomateriais e equilíbrio de adsorção.

2.1 INTRODUÇÃO

2.1.1 Enzimas

As enzimas são freqüentemente usadas como biocatalisadores industriais na forma livre e imobilizadas para simplificar sua reutilização e recuperação. São diversos os protocolos de imobilização que envolvem diferentes mecanismos de imobilização enzimática tais como adsorção física, aprisionamento, microencapsulação, fixação covalente e reticulação (HOMEI et al., 2013), e todos os métodos podem apresentar uma série de vantagens e desvantagens (DANTAS et al., 2020; LEE et al., 2021).

A aplicação de enzimas em diferentes indústrias está aumentando continuamente, especialmente nas últimas duas décadas (VOBĚRKOVÁ et al., 2018). Na indústria alimentícia a enzima β -galactosidase (lactase, EC 3.2.1.23), uma hidrolase, tem sido usada principalmente na forma livre nas indústrias de laticínio. Contudo, devido ao custo relativamente elevado, pesquisas com objetivo de minimizar esse problema têm sido voltadas na obtenção de biocatalisador imobilizado que atenda aos processos industriais (RAVEENDRAN et al., 2018; KURIBAYASHI et al., 2021).

A imobilização enzimática, em muitos casos, melhora as características do biocatalisador como especificidade, estabilidade, seletividade e atividade (LIU et al., 2018), e esta relacionados aos materiais de suporte enzimáticos que devem atender requisitos para resistir às condições das reações enzimáticas, como: boa estabilidade, estar facilmente disponíveis durante o ano todo, com precificação relativamente baixa (ZDARTA et al., 2018).

Desta forma, os materiais de suporte influenciam a atividade das enzimas imobilizadas especificamente nas propriedades dos diferentes suportes orgânicos e inorgânicos devido aos

grupos funcionais presentes na superfície que podem favorecer e estabilizar a enzima com reutilizações sucessivas (WAHAB et al., 2020; NADAR et al., 2020).

Na busca por materiais de suporte para imobilização enzimática, os materiais híbridos ou compostos têm ganhado atenção. Estes são obtidos pela conjugação de materiais orgânico-orgânico; inorgânico-inorgânico, ou precursores orgânicos-inorgânicos que tornam possível a estabilidade das interações entre uma enzima a um suporte, possibilitando a obtenção de biocatalisadores de maior resistência mecânica e estabilidade em condições de reação (ZDARTA et al., 2018).

Muitos suportes foram utilizados na imobilização da β -galactosidase, uma enzima utilizada industrialmente tanto na forma livre (solúvel) quanto imobilizada com protocolos de imobilização apropriados (KLEIN et al., 2016).

Sendo assim, esta revisão teve por objetivo estabelecer à compreensão e o conhecimento dos aspectos importantes concernentes à enzima β -galactosidase, que é tema desta dissertação, elucidando: enzimas industriais, enzima β -galactosidase, imobilização de enzimas (métodos químicos e físicos), equilíbrio de adsorção, suportes de imobilização, reatores utilizados, estabilidade de enzimas (pH, força iônica, temperatura e aditivos) e aplicações recentes da enzima β -galactosidase.

2.1.2 Enzimas industriais

O mercado de enzimas é muito amplo, podendo ser produzidas por plantas, animais e via microbiana, sendo que a maior parte da produção industrial de enzimas é obtida por microrganismos (RAVEENDRAN et al., 2018).

O relatório de previsão global do mercado de enzimas para 2025 prevê o crescimento de 1 a 7,1% a partir de 2019 para chegar a US \$ 6,6 bilhões em 2025, principalmente para o mercado de enzimas especiais como: hidrolases, carboidrases, proteases, lipases, polimerases e nucleases e outras enzimas. Além disso, as enzimas microbianas são uma fonte importante no mercado industrial devido a sua diversidade, elevada estabilidade e capacidade de degradar uma ampla gama de complexos substratos. No entanto, o crescimento do uso de enzimas em determinados processos é inibido pelo alto custo, em particular para pequenas e médias empresas (GLOBAL SPECIALITY ENZYMES INDUSTRY, 2020).

As enzimas são empregadas para obter mais de 700 produtos comerciais nas mais diversas áreas entre produtos e soluções, e são utilizadas em mais de 40 setores da indústria

desde cuidados domésticos (por exemplo, detergentes) e bioenergia à agricultura, saúde animal, comésticos, medicamentos e alimentos (ARNAU et al., 2021).

Em destaque, os principais produtores de enzimas incluem a BASF® (Alemanha), DuPont® (EUA), Novozymes® (Dinamarca), DSM® (Holanda), Advanced Enzymes Technologies® (Índia), Megazyme® (Irlanda), Denykem® (Reino Unido) e MetGen® (Finlândia) (TECHNICAL ENZYMES MARKET, 2020).

Com o avanço biotecnológico, nota-se o aumento da demanda por enzimas como biocatalisador em processos industriais, pois a natureza das enzimas apresenta características ambientais corretas com baixo gasto de energia, criando um roteiro para produção mais limpa, com crescimento sustentável e econômico (KHARE; PRAKASH, 2017).

Na indústria de alimentos várias enzimas têm sido utilizadas em busca de se produzir e melhorar a qualidade dos alimentos. Desta forma, a maior aplicação de enzimas está concentrada na indústria de alimentos - quase 50% de todas as enzimas produzidas para fins industriais são utilizadas no processamento de alimentos (SINGH et al., 2019; KANEDA et al., 2021; ADHIKARI, 2019). Dentre as enzimas industriais mais comumente usadas na área de alimentos estão as hidrolases, carboidrases, proteases, lipases, oxidorreduções e isomerases, sendo que a maioria destas enzimas é de origem microbiana e apenas algumas vêm de animais ou plantas superiores (SINGH et al., 2016).

Alguns exemplos de enzimas utilizadas industrialmente estão descritos na Tabela 2.1.

Tabela 2. 1– Enzimas livres (solúvel) ou imobilizadas utilizadas industrialmente

Enzimas	Livre/ imobilizada	Aplicação	Produto	Referências
β -Galactosidase	Imobilizada	Alimentos	Tagatose (adoçante alto pico de doçura)	Chini et Al., 2014
β -glucosidase	Livre	Melhora o aroma vinho/ extração de pigmentos e substâncias aromatizantes	Indústria de vinho	Juturu; Wu, 2014
Xilanases	Livre	Clarificação de sucos e vinhos	Aumentam a clarificação	Adigüzel; Tunçer, 2016
Epimerase	Imobilizada	Fabricação de alimentos e bebidas	Alulose - adoçante “zero caloria” semelhante à dextrose	Tate;Lyle, 2017

Enzimas	Livre/ imobilizada	Aplicação	Produto	Referências
β -Galactosidase	Livre/ Imobilizada	Indústria de Laticínios	Valio®, produz a maior variedade de produtos com baixo teor de lactose e sem lactose	Araujo, 2017
β -galactosidase	Livre	Prebióticos/ produtos farmacêuticos/ compostos biológicos ativos	Galacto-oligossacarídeos (GOS)	Xavieret al., 2018
Debittering - naringinase	Imobilizada	Indústria de suco de fruta	Remoção do sabor amargo de frutas cítricas	Phukan; Kardong, 2020
D-Glucose / xilose isomerase	Imobilizada	Refrigerantes/ sucos caixinha/ketchup/ mostarda/ pó para bebidas	Xarope de milho com alto teor de frutose	Singh et al., 2020

Valio® = Fabricante de produtos lácteos, uma das maiores empresas da Finlândia.

Fonte: Elaborado pela autora (2022).

2.2 ENZIMA B-GALACTOSIDASE

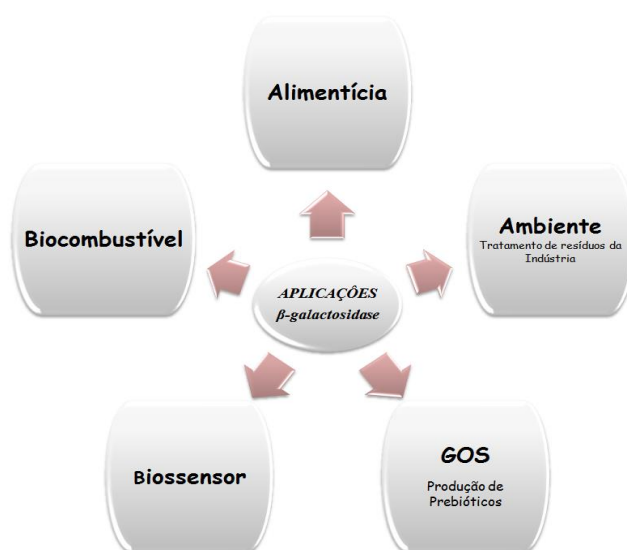
A β -galactosidase (β -d-galacto-hidrolase, EC 3.2.1.23), conhecida como lactase, pertence às glicosidases que apresentam tanto a atividade de hidrólise quanto de transglicosilação, que representa a capacidade de sintetizar oligossacarídeos durante a hidrólise de substratos naturais, e também um potencial em pesquisa de aplicações em diferentes áreas como nas indústrias de alimentos e laticínios, nutrição, biorremediação, biossensor (SAQIB et al., 2017).

As β -galactosidases convencionais se concentram na hidrólise da lactose para produção de leite e outros produtos lácteos com baixo teor de lactose e sem lactose, como também comprimidos de lactase para pessoas que possuem intolerância à lactose. Outra aplicação da β -galactosidase é na produção de xaropes de soro de leite e na biodisponibilidade de produtos derivados do soro de leite e no gerenciamento de resíduos de laticínios (VERA et al., 2020; LUKITO et al. 2015).

As aplicações de β -galactosidases não convencionais referem-se àquelas aplicações mais recentes baseadas em sua reação catalítica de transgalactosilação (OSMAN et al., 2014; VERA et al., 2017), ao uso de líquidos iônicos (SIMOVIĆ et al., 2019; ARGENTA, et al., 2021), ou qualquer outro composto em baixa atividade de água (MANERA et al., 2012).

Na Figura 2.1 estão apresentadas as principais aplicações da enzima β -galactosidase discutidos ao longo deste artigo.

Figura 2. 1– Diferentes aplicações da enzima β -galactosidase.



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Dentre as aplicações da enzima β -galactosidase existem duas funções de catálise: hidrólise e transgalactosilação. Esta hidrólise catalítica da lactose é uma reação direta e a síntese de oligossacarídeos é a reação reversa. A primeira função relaciona-se a hidrólise da lactose obtendo dois monômeros, a glicose e a galactose, enquanto a segunda envolve a clivagem do galactosil e, subseqüentemente, a transferência para uma molécula aceptora, formando o transgalactooligossacarídeo (GOS), tornando esta enzima importante na indústria de alimentos (XU et al., 2020).

A hidrólise da lactose em escala industrial geralmente é realizada com o uso de β -galactosidase em sua forma livre líquida ou em pó (liofilizada) (PANESAR et al., 2010). Com o processo de hidrólise são formados dois monossacarídeos (glicose e galactose) (GARCIA et al., 2017).

Os monossacarídeos obtidos da hidrólise, além de apresentarem características de maior doçura, também são mais solúveis quando comparado ao dissacarídeo (lactose), com isto diminui a cristalização em produtos lácteos (SHEN et al., 2019). Na Tabela 2.2 estão informações sobre doçura, configuração, monômeros e solubilidade da sacarose e lactose.

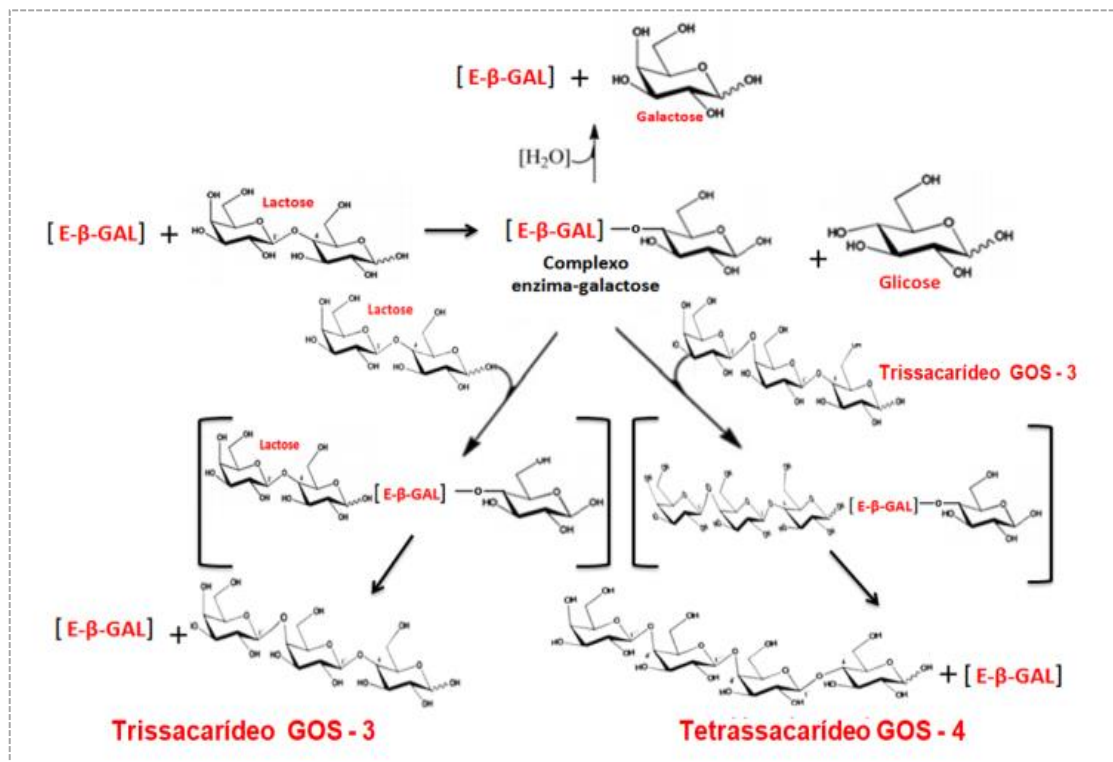
Tabela 2. 2 – Propriedades dos dissacarídeos nome comum, doçura, configuração e solubilidade a 30°C.

Dissacarídeo	Sacarose	Lactose
Nome comum	Açúcar de mesa	Açúcar do Leite
Doçura	100%	16%
Configuração	α (1 \rightarrow 2) β	β (1 \rightarrow 4)
Solubilidade dos dissacarídeos (30°C)	60	20
Solubilidade dos monômeros (30°C)	D-Glicose - 54	D-Galactose - 36
	D-Frutose - 82	D-Glicose - 54
Doçura dos monômeros (Comparado a doçura da sacarose)	D-Glicose - 74%	D-Galactose - 36%
	D-Frutose - 173%	D-Glicose - 74%

Fonte: Adaptado de COLE, KRAMER (2016); FISCHER (2010).

As atividades enzimáticas, hidrolítica e de transgalactosilação, estão presentes durante uma reação, sendo esta síntese de compostos transgalactosilados por β -galactosidases uma reação cineticamente controlada (VERA et al., 2017). Na Figura 2.2 é apresentada a reação de hidrólise da lactose e formação de GOS.

Figura 2.2 – Atividades hidrolítica e de transgalactosilação por β -galactosidases.



Fonte: Adaptado de VERA et al. (2017); GONAWAN, (2019).

A hidrólise da lactose pode ser favorecida com baixa concentração de lactose e enzima imobilizada enquanto que a transgalactosilação poderá ser favorecida com alta concentração de lactose temperatura elevada e baixa atividade de água no meio reacional ou por outras moléculas como galactose ou GOS 3 (CAREVIĆ et al., 2017; GARCIA et al., 2017).

O mecanismo descrito na Figura 2.3 ocorre da seguinte maneira, a β -Gal-gal é o intermediário chave que leva a formação de galactose e GOS, dependendo das moléculas aceitadoras. O β -Gal-gal pode ser hidrolisado recebendo água (íon hidrônio) como aceitador de galactosil para formar galactose e β -Gal livre. Além disso, a lactose também pode ser um galactosilaceitador para β -Gal-gal e, posteriormente, irá produzir GOS com GP (grau de polimerização) = 3. O β -Gal-gal pode transferir a porção de galactose para qualquer molécula de GOS onde um GOS com GP > 3 é formado. Em uma análise próxima a reação pode ser deslocada para a frente aumentando a concentração de lactose. Isto é devido ao fato de que a lactose é importante como um doador de elétrons competitivo (ou seja, aceitador de galactosil) para a porção de galactose ligada a β -Gal-gal, bem como fornecendo alta concentração de β -Gal-gal por reação de hidrólise, em resumo, as concentrações de lactose e β -Gal-gal são muito importante para a formação do GOS pela β -Gal (GONAWAN, 2019).

Muitos destes oligossacarídeos apresentam efeito prebiótico e são usados largamente na produção de doces, massas, pães e geléias, aditivos em formulações infantis no intuito de mimetizar o efeito bifidogênico, ou seja, estímulo ao crescimento de bifidobactérias que reduzem a atividade de bactérias putrefativas. Esses efeitos envolvem equilíbrio bacteriano intestinal e outros, como prevenção do câncer, diarreias e intolerância à lactose (BRUNO-BARCENA; AZCARATE-PERIL, 2015).

A estrutura das β -galactosidases depende do organismo produtor. A exemplo disto, enquanto a β -galactosidase da levedura *Kluyveromyces lactis* são diméricas ou tetraméricas, as de *Escherichia coli* são tetraméricas. Estruturas monoméricas e triméricas foram observadas em β -galactosidase de fígado humano e *Thermusthermophilus* A4. As β -galactosidases de bactérias lácticas são principalmente hetero diméricas, e isso foi observado também em enzimas de tipo selvagem e variantes mutagenizadas de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (XU et al., 2020).

Estas extraordinárias enzimas podem ser obtidas de várias fontes: plantas animais, e microrganismos como fungos, leveduras e bactérias. A fonte microbiana é uma das mais descritas na literatura pelo fato de haver inúmeras aplicações nas áreas biotecnológicas, indústria ambiental e alimentícia (SUÁREZ et al., 2018; SNEHA et al., 2019; SAQIB et al., 2017).

A β -galactosidase extraída de fontes bacterianas tem sido usada para a hidrólise da lactose e entre as cepas bacterianas estudadas podem-se citar a *Bifidobacterium infantis*, *Bacillus subtilis* em esporos bacterianos (UGWUODO; NWAGU, 2020), *Bifidobacterium longum* e *Bacillus licheniformis* (SAQIB et al, 2017).

As fontes fúngicas mais comuns de β -galactosidases são *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces fragilis*, *Kluyveromyces marxianus* e algumas espécies de *Aspergillus* como *Aspergillus oryzae* e *Aspergillus niger*, entre outras (MORIOKA et al., 2019). Elas também são amplamente distribuídas em plantas, onde contribuem para o crescimento da planta, na hidrólise da lactose e amadurecimento dos frutos. Há relatos de β -galactosidases purificadas obtidas de tomate, maçã, café, manga, melão, abacate e kiwi (SEDDIGH; DARABI, 2014).

As β -galactosidases termoativas adaptadas ao frio podem ser produzidas por várias bactérias como *Bacillus licheniformis*, *Lactobacillus acidophilus* R22, *Geobacillus stearothermophilus*, *Sulfolobus solfataricus*, *Enterobacterag glomerans* B1, *Thermotoga maritima*, *Alicyclobacillus acido caldarius* sp., *Arthrobacter psychrolactophilus* (ANISHA, 2017; SAQIB et al, 2017). Estas enzimas ativas no frio possibilitam sua aplicação no tratamento do leite e dos produtos lácteos sob condições que permitem preservar o sabor e as características nutricionais desses alimentos. Em particular, sua alta atividade em baixas temperaturas e termolabilidade as tornam adequadas para o processo em lote, realizado sob agitação lenta por 24 h, a 4–8° C, antes da pasteurização e embalagem (MANGIAGALLI et al., 2021)

As galactosidases podem também ser advindas de animais, porém, as de origem microbiana são mais utilizadas por várias razões como, por exemplo, produção independente de fatores sazonais, possibilidade da utilização de substratos baratos (resíduos agrícolas) e o fato de o rendimento na produção poder ser elevado a partir da otimização das condições nos processos fermentativos por mutações ou a partir da tecnologia do DNA recombinante (SAQIB et al., 2017).

Relatado por Anisha (2017), as β -galactosidases destinadas ao uso na produção em escalas industriais advém de microrganismos seguros, com a classificação de *Generally Recognized As Safe* (GRAS) são regulamentados por órgãos fiscalizadores como a *Food and Drug Administration* (FDA) que é um órgão americano que tem a competência de aprovar o uso de insumos e outros.

Outra vertente ao uso da lactase está no fato de existir preparações comerciais disponíveis que podem ser ingeridas por via oral no consumo direto, promovendo a digestão da lactose presente nos laticínios ingeridos. Francesconi et al. (2016) avaliaram a

administração oral de lactase exógena em comprimidos em pacientes portadores de intolerância à lactose devido à hipolactasia primária. Os autores concluíram que o produto experimental contendo lactase exógena em comprimidos administrados por via oral não foi inferior ao produto de referência e desta forma obtiveram uma terapia eficaz.

Em outro estudo Ahmed et al. (2018), avaliaram a eficácia clínica do suplemento de enzima lactase na cólica infantil sendo um estudo controlado randomizado. Os pesquisadores observaram melhora significativa na duração do choro em bebês que receberam suplemento de enzima lactase.

2.3 IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS

Em processos industriais, a utilização de biocatalisadores livres muitas vezes se torna um obstáculo financeiro para as empresas, dependendo da enzima e do processo. Por outro lado, a tecnologia de enzimas imobilizadas pode ser uma boa opção para a diminuição dos custos operacionais, sendo que uma das principais vantagens é a reutilização do biocatalisador. Além disso, um protocolo de imobilização adequado pode melhorar a estabilidade e resistência a produtos químicos, mantendo a atividade, especificidade e seletividade enzimática próxima à enzima livre (HWANG; LEE, 2019; BILAL et al., 2019; THOMPSON et al., 2018; LI et al., 2021, ABADA, 2019, YU; O’SULLIVAN, 2018).

Sheldon e Pelt (2013), em seu artigo de revisão, apresentaram uma visão geral do porquê, o quê e como a imobilização se apresenta como tecnologia chave para viabilidade prática e comercial, resultando na melhoria da estabilidade e reciclagem do biocatalisador em comparação com a enzima livre, enfatizando que, independentemente do método usado, deve-se analisar o rendimento, a eficiência, a recuperação da atividade, a carga da enzima (% em peso no biocatalisador) e as propriedades físicas, por exemplo, tamanho e densidade das partículas, hidrofobicidade e robustez mecânica do imobilizado, ou seja, a enzima imobilizada como um todo (enzima + suporte).

Um fato a ser levado em consideração nas imobilizações enzimáticas está relacionado a dessorção da enzima do suporte, que pode ocorrer quando se utiliza métodos físicos de imobilização, como por exemplo, a adsorção física, ligação iônica ou afinidade, ou então de variações de pH, força iônica, etc. (AHMAD; SARDAR, 2015).

Há de se mencionar sobre a heterofuncionalidade do suporte significa que estes possuem diferentes funcionalidades em sua superfície capazes de interagir com a enzima

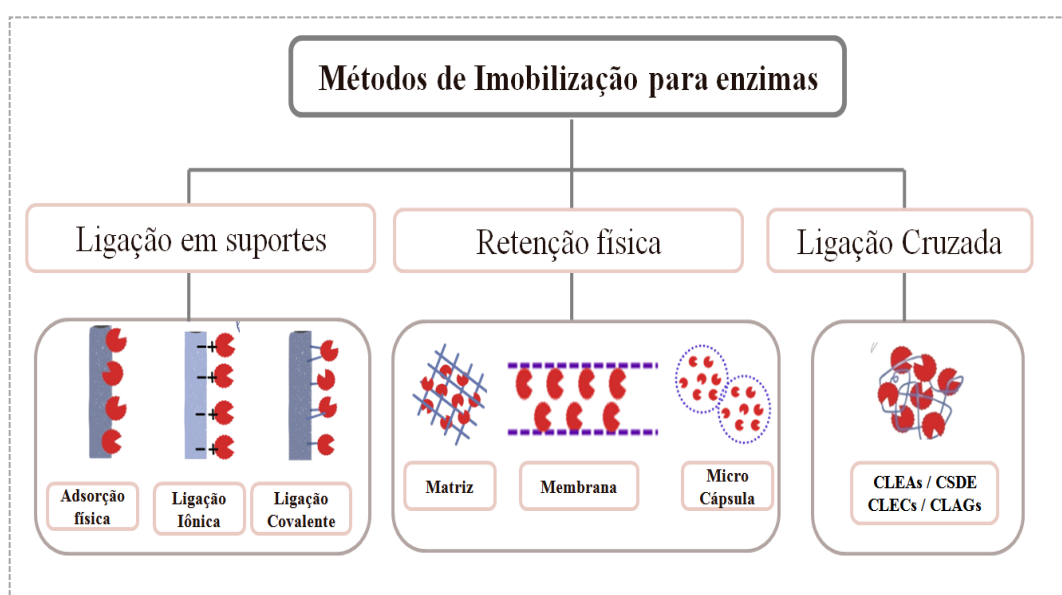
como, por exemplo, troca iônica, interação hidrofóbica e covalente (VERA et al., 2017; GONÇALVES et al., 2018).

Essa heterofuncionalidade do suporte foi estudada por Zaak et al. (2018), que prepararam um novo suporte de agarose heterofuncional amino-vinilsulfona que foi empregado para imobilizar β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* em valores de pH de 5,0 a 9,0, usando 5 mM em diferentes tampões a 25°C por troca iônica estabelecendo ligações covalentes. Os pesquisadores relataram que mesmo com a alta reatividade do grupo vinilsulfona, o primeiro passo da imobilização da enzima foi claramente a troca iônica, e somente após a primeira imobilização, a enzima foi capaz de reagir covalentemente com o suporte heterofuncional resultando num fator de estabilização na atividade enzimática 15 vezes maior comparado à enzima adsorvida apenas ionicamente em pH 5,0.

2.3.1 Métodos de imobilização

A tecnologia de imobilização de enzimas envolve várias técnicas em diversos tipos de matrizes (SHAHID et al., 2017). Os métodos de imobilização podem ser divididos em três categorias: imobilização por ligação em suportes, retenção física e ligação cruzada e são apresentados na Figura 2.3 e serão descritos a seguir.

Figura 2. 3 – Métodos de imobilização enzimática ligação em suportes, retenção física e ligação cruzada.



Fonte: Adaptado de FISCHER (2013).

2.3.1.1 Métodos químicos

2.3.1.1.1 Imobilização por ligação covalente

A imobilização covalente inclui a formação de uma forte ligação entre a enzima e o suporte, onde envolve a formação de grupos eletrofilicos do suporte ligando-se a nucleófilos fortes das proteínas. Este método é estável e evita a dessorção da enzima quando submetida a mudanças ambientais, porém, é um método complexo quando comparado a outros métodos, podendo levar a mudanças drásticas nas propriedades conformacionais e catalíticas da enzima, modificando a estrutura tridimensional da proteína após a fixação ao suporte (DWEVEDI, 2016).

A imobilização por ligação covalente ou fixação covalente multiponto pode ocasionar melhora na estabilidade da enzima, pois ao usar a reticulação proporcionará a fixação da enzima por reagentes que podem ser ligantes bi ou multifuncionais, formando agregados de alto peso molecular tipicamente insolúvel (REIS et al., 2019).

Na imobilização covalente a conexão entre o suporte e a enzima pode ser obtida por ligação intercalada de diferentes comprimentos chamado de espaçador, e isto ocasiona um maior grau de mobilidade para o biocatalisador acoplado, de modo que sua atividade possa ser melhorada quando comparado ao biocatalisador de acoplamento direto (REIS et al., 2019).

Quando a enzima é imobilizada covalentemente ocorre a reação com seus grupos aminos, como α -NH₂ da cadeia terminal, ϵ -NH₂ da lisina e/ou NH₂ proveniente de aminação química. Estes grupos formam as bases de *Schiff* que se ligam aos grupos aldeídos do suporte (SILVA et al., 2021). Isso foi demonstrado para suportes ativados por glutaraldeído, de forma que a primeira causa de imobilização é a troca iônica no suporte aminaado e, após essa primeira abordagem, forma-se uma ligação covalente entre glutaraldeído e enzima (ANDRADES et al., 2019; ZAAK et al., 2017). As principais vantagens desse método consistem em maior resistência do biocatalisador quanto à variação de pH, temperatura e incubação em solventes orgânicos e o fato de a enzima não ser dessorvida do suporte (WAHBA, 2017).

Na Tabela 2.3 são apresentados alguns estudos sobre a imobilização covalente β -galactosidase de diferentes fontes.

Tabela 2. 3 – Estratégias de imobilização covalente para β -galactosidase de diferentes fontes.

Fonte da β -galactosidase	Suporte	Tampão e Força iônica	pH e temperatura ótimos	Estabilidade de operação	Aplicações biotecnológicas	Referências
<i>Aspergillus oryzae</i>	Discos de ágar	Acetato de sódio 100 mM	pH 4,5 55°C	15 ciclos	Novos discos de ágar enxertados foram preparados para a imobilização covalente	Wahba; Hassan et al., 2015
<i>Escherichia coli</i>	Suportes IMAC	Citrato de fosfato 50 mM	pH 7,0 25°C	20 ciclos	Síntese de Galacto-oligossacarídeos	Benavente et al., 2015
<i>Aspergillus oryzae</i>	Pérolas de pectinato de cálcio	Fosfato de sódio 100 mM	pH 7,2	14 ciclos	Aumento na resistência mecânica dos grânulos	Wahba, 2016
<i>Aspergillus oryzae</i>	Grânulos de quitosana porosa	Citrato-fosfato 100 mM	pH 4,5 60°C	13 ciclos	Propriedades mecânicas superiores nos grânulos	Wahba, 2017
<i>Aspergillus oryzae</i>	Contas de vidro funcionalizada	Acetato de sódio 10 mM	pH 5,2, 60 °C	8 ciclos	Síntese de Galacto-oligossacarídeos (GOS)	Eskandarloo Abbaspourrad 2018
<i>Escherichia coli</i>	Filme polimérico à base de epóxi	Fosfato de sódio 10 mM	pH 6,5 25°C	12 ciclos	Usado como fotoiniciador	Beyler-Çigil et al., 2021
<i>Aspergillus oryzae</i>	Grupos epóxi do Immobead 150	Acetato de sódio 100 mM	pH 4,5 30°C	20 ciclos	Modificação do suporte Immobead 150	Gennari et al., 2018
<i>Aspergillus oryzae</i>	Esferas de gel de pectinato de cálcio	Citrato de fosfato 100 mM	pH 7,02 25°C	14 ciclos	Hidrólise da lactose	Wahba et al., 2016
<i>Kluyveromyces marxianus</i> NCIM 3551	Alginato de sódio	Citrato de fosfato 100 mM	pH 4,0–8,0 40°C	10 ciclos	Transgalactosilação	Srivastava et al., 2016
<i>Aspergillus oryzae</i>	Membrana de	Citrato de	pH 6,8	20 ciclos	Síntese de Xarope de	Vasileva et al., 2016

Fonte da β -galactosidase	Suporte	Tampão e Força iônica	pH e temperatura ótimos	Estabilidade de operação	Aplicações biotecnológicas	Referências
	polipropileno modificada	fosfato 100 mM	40°C		glicose-galactose	
<i>Kluyveromyces lactis</i>	Polímero de polissiloxano-álcool polivinílico (POS-PVA)	Citrato de fosfato 20 mM	pH 7,0 25°C	4 ciclos	Transgalactosilação	González-Cataño et al., 2017
<i>Aspergillus oryzae</i>	Sílica	Fosfato de potássio 50 mM	pH 7,0 37°C	10 ciclos	Hidrólise da lactose	Li et al., 2018
<i>Aspergillus oryzae</i>	Esferas de polietilenoimina (PEI) com pectinato de cálcio refinado com glutaraldeído	Citrato de fosfato 100 mM	pH 7,5 55°C	-	Matrizes de imobilização covalente aprimoradas	Wahba et al., 2020
<i>Aspergillus oryzae</i>	Tapetes de nanofibras de gelatina eletrofiados (GFM)	Citrato de fosfato 20 mM	pH 4,5, 30°C	20 ciclos	Síntese de Galacto-oligossacarídeos (GOS)	Sass et al., 2020

Fonte: Elaborado pela autora (2022).

2.3.1.1.2 Imobilização por reticulação

A copolimerização ou reticulação de enzimas é um método que foi desenvolvido no ano de 1960, que utilizou a reticulação da proteína com grupos NH₂ como o agente de reticulação bifuncional, glutaraldeído. No entanto algumas desvantagens aconteceram como baixa retenção de atividade, baixa estabilidade mecânica, reprodutibilidade pobre e dificuldades no manuseio das enzimas reticuladas que eram gelatinosas. No entanto com os avanços das pesquisas verificou-se que a ligação cruzada desses agregados físicos os tornaria permanentemente insolúveis, mantendo sua superestrutura organizada com atividade catalítica, e além disso economicamente viável e levou ao desenvolvimento de agregados enzimáticos reticulados (CLEA), que teve os primeiros exemplos de CLEAs utilizando de derivados da penicilina G amidase, uma enzima industrialmente importante que é usada na síntese de antibióticos semissintéticos, como a penicilina e cefalosporina (SNEHA et al., 2019, CLEA)(CUI; JIA 2013).

Os CLEAs são produzidos por precipitação simples da enzima de solução como agregados físicos de moléculas de proteína, pela adição de sais, ou solventes orgânicos miscíveis em água ou polímeros não iônicos e que são mantidos por ligação não covalente (SATAR et al., 2018). A ativação de suporte com estes reagentes de reticulação, curtos ou longos, geralmente é necessária para fornecer locais catalíticos mais acessíveis para a fixação da enzima (YAMAGUCHI et al., 2018).

A reticulação envolve a fixação por reagentes ou ligantes bi ou multifuncionais, formando agregados de peso molecular muito alto, tipicamente insolúvel. Na maioria das vezes o agente bifuncional comumente usado para a reticulação é o glutaraldeído, pois os grupos aldeído reativos nas duas extremidades do glutaraldeído reagem com os grupos amino livres de enzimas por meio de uma reação de base e têm sido utilizado pelo baixo custo, alta eficiência e estabilidade. No entanto a reação de reticulação não é facilmente controlada e por isso é muito difícil conseguir grandes agregados de enzimas com alta retenção de atividade (YAMAGUCHI et al., 2018).

Pode-se citar algumas vantagens significativas ao uso dos CLEAS, como, possui uma boa estabilidade e rigidez da estrutura terciária da enzima devido à extensa reticulação empregada e conseqüentemente evita a desnaturação das enzimas por meio de ligações múltiplas das moléculas. Cui et al. (2014), estudaram agregados enzimáticos híbridos reticulados com lise e magnéticos de fenilalanina de amônia (HM-PAL-CLEAs) em nanopartículas de magnetita e subsequente reticulação com glutaraldeído. Em seus resultados

puderam facilmente separar os agregados da mistura de reação usando um campo magnético externo e concluíram que a tecnologia de CLEAs, utilizando magnéticos híbridos, pode ser utilizada como uma solução viável e eficiente para melhorar as propriedades da enzima imobilizada em aplicações industriais.

Xu et al.(2020), avaliaram a CLEA de β -galactosidases e compararam a enzima livre e a imobilizadas, e perceberam que a formação de CLEA tinha potencial para converter lactose em GOS. Estas descobertas indicaram que agregados enzimáticos reticulados podem ser uma técnica promissora para imobilizar β -galactosidase, e que a enzima imobilizada resultante é adequada para aplicações na indústria de alimentos.

Na imobilização enzimática livre de suportes ou transportadores a enzima pode ser imobilizada por precipitação (CLE), ou podem receber a designação de cristais de enzima reticulada (CLECs), podem ser reticuladas por *spray-drier* (CSDE), e agregados enzimáticos reticulados (CLEAs) (DORAISWAMY et al., 2019; VOBĚRKOVÁ et al., 2018; DORAISWAMY et al., 2020).

As CLEAs são produzidas por precipitação simples da enzima em solução como agregados físicos de moléculas, na adição de sais ou solventes orgânicos miscíveis em água ou polímeros não iônicos (SATAR et al., 2018), e tem benefícios no contexto de aplicações na indústria como, por exemplo, não há necessidade ao uso de enzimas altamente puras, podem ser feitas com preparação enzimática rudimentares diretamente de extratos de células livres (crus) obtidos do caldo de fermentação (SHELDON; VAN PELT, 2013).

Em relação ao uso de *spray-dryer* para reticulações (CSDEs), percebeu-se que tal processo evita a degradação das enzimas e que tecnicamente é possível controlar o tamanho de partícula do biocatalizador, porém há de se ter o devido cuidado em relação a secagem em *spray-dryer* pois o mesmo pode ocasionar a desnaturação da enzima durante secagem ocasionada por elevada temperatura (FILHO et al., 2019).

Outros trabalhos empregando reticulação para imobilização utilizando a enzima β -galactosidase obtida de várias fontes são apresentados na Tabela 2.4.

Tabela 2. 4 – Reticulação com β -galactosidase de diferentes fontes e método de reticulação.

Fontes β -galactosidase	Suporte	Método de imobilização	pH ótimo e temperatura	Agente reticulante	Tampão e Força iônica	Aplicações biotecnológicas	Referências
<i>Aspergillus oryzae</i>	-	CLEA	pH 7,0 25°C	-	Fosfato de citrato 50 mM	Síntese de GOS	Li et al., 2015
<i>Lactobacillus plantarum HF571129</i>	Nanopartículas de óxido de zinco(ZnO NPs)	Adsorção e reticulação	pH 5-7,5 30 °C	Glutaraldeído	Fosfato de sódio 100 mM	Tecnologia para hidrólise de lactose	Selvarajan et al., 2015
<i>Aspergillus oryzae</i>	-	Agregação e reticulação	pH 4,5; 50 °C	Taraldeído	Fósforo de potássio 100 mM	Síntese de lactulose	Guerrero et al., 2015
<i>Aspergillus oryzae</i>	-	Reticulação com Glutaraldeído-agarose	pH 7,0 50°C	Glutaraldeído	Fosfato de sódio 50 mM	Transgalactosilação	Cardelle-Cobas et al., 2016
<i>Aspergillus oryzae</i>	-	Agregação e reticulação (CLAGs)	pH 4,5 42°C	Glutaraldeído	Solução 200 mM de cloreto de cálcio	Purificação de GOS	Aburto et al., 2018
<i>Aspergillus oryzae</i>	Monólito de polimetacrilato	Reticulação	pH 7,2 37°C	Glutaraldeído e diisocianato de hexametileno	Fosfato de sódio 20mM	Efeito de reticulantes na imobilização	Dahari et al., 2018
<i>Aspergillus oryzae</i>	-	Aprisionamento e reticulação	pH 4,5 50 °C	-	-	Síntese de lactulose	Guerrero et al., 2019
<i>Aspergillus oryzae</i>	-	Precipitação e reticulação	pH 7,0 25°C	Glutaraldeído	Fosfato -Citrato 100 mM	Síntese de frutose de lactose	Araya et al., 2019
<i>Lactobacillus leichmannii</i> 313	-	CLEA	pH 7,0	Glutaraldeído	Fosfato de sódio 50 mM	Síntese de GOS	Xu et al., 2020
<i>Bacillus circulans</i>	-	Agregação e reticulação (CLAGs)	pH 6,0	Glutaraldeído	-	Síntese de Lactulose	Siancas et al., 2020

Fonte: Elaborado pela autora (2022).

2.3.1.2 Métodos físicos

2.3.1.2.1 Encapsulação/Aprisionamento

O encapsulamento é baseado no aprisionamento da enzima em material orgânico ou inorgânico, materiais como nanopartículas de sílica (NPs), polímeros, nanoemulsões ou nanoflores (híbridos orgânico-inorgânicos semelhantes a flores) (LEE et al., 2015). Uma das grandes vantagens é que essa técnica facilita a difusão de substratos ou produtos quando se forma as nanoestruturas, sendo uma técnica bem estabelecida para encapsular enzimas, anticorpos e outras proteínas em um estado funcional é usar o alginato e/ou método químico sol-gel (NAWAZ, et al., 2015).

Esta técnica não envolve ligações químicas entre o suporte e a proteína, que é simplesmente incluída em uma rede 3D do suporte que impossibilita a difusão da enzima para longe do carreador. Este método também causa modificação mínima da estrutura nativa, mas o vazamento da enzima poderá ocorrer (ZUCCA; SANJUST, 2014).

O aprisionamento é um método conveniente para uso em processos envolvendo substratos e produtos de baixo peso molecular, sendo que grandes moléculas têm dificuldades difusionais ao aproximarem-se dos sítios catalíticos das enzimas aprisionadas (SNEHA et al., 2019).

A imobilização de enzimas por aprisionamento utiliza-se de géis e pode ser realizado de quatro maneiras principais: métodos sol-gel, polimerização para formar polímeros insolúveis, reticulação de biopolímeros e montagem supramolecular (IMAM et al., 2021).

Em relação ao aspecto dos géis, o sol-gel possui aspecto de vidro quimicamente inerte que pode ser moldado da maneira desejada e depois forma um gel duro. A montagem supramolecular forma um gel macio e os géis de polímeros e biopolímeros podem ser duros ou macios (HOMAEI et al., 2013; IMAM et al., 2021).

Relatado por Bilal e Iqbal (2019) em um artigo de revisão, os biopolímeros à base de carboidratos são biocompatíveis contendo vários grupos funcionais, o que tornam essas moléculas adequadas para imobilização de enzimas por meio dos métodos de aprisionamento e/ou encapsulamento.

Algumas pesquisas da literatura que relatam imobilização de β -galactosidase de diferentes fontes pelo método de aprisionamento/encapsulação estão apresentadas na Tabela 2.5.

Tabela 2.5 – Imobilizações de β -galactosidase de diferentes fontes por aprisionamento/encapsulação.

Fontes β -galactosidase	Suporte/Material	Método de imobilização	Tampão e Força iônica	pH ótimo e temperatura	Aplicação Biotecnologica	Referências
<i>Bacillus circulans</i>	Alginato de cálcio	Encapsulação	Acetato de sódio 100 mM	pH 6,5 37°C	GOS	Sen et al., 2015
<i>Escherichia coli</i>	Microencapsulação quitosana modificada	Encapsulação	-	pH 6,0	Influência do pH	Estevinho et al., 2015
<i>Kluyveromyces lactis</i>	Híbridos de sol-gel orgânico- inorgânico com estrutura microporosa	Aprisionamento	Fosfato de Potássio 20 mM	pH 7,5	Hidrólise de lactose	Biró et al., 2016
<i>Kluyveromyces lactis</i>	Esferas de alginato de cálcio e gelatina	Encapsulação	Fosfato de sódio potássio 100 mM	pH7,0 35°C	Hidrólise de lactose de soro de queijo	Mörschbacher et al., 2016
<i>Kluyveromyces lactis</i>	Grânulos de hidrogel à base de κ -carragenina	Encapsulação	PBS(solução salina tampão de fosfato)20 mM	pH 7,0	Galacto-oligossacarídeos (GOS)	Zhang et al., 2016
<i>Rahnellasp. R3</i>	Goma gelana	Encapsulação	TRIS 10 mM	pH 7,0 4°C	Atividade a baixa temperatura	Fan; Roos., 2017
<i>Kluyveromyces lactis</i>	Grânulos de hidrogel em microambientes	Encapsulação	Hidróxido de magnésio	pH 7,0	Impacto das características do grânulo na atividade enzimática	Zang et al., 2017
<i>Escherichia coli</i>	Quitosana-cinamato foto- responsivo	Aprisionamento	-	pH 6,5 55°C	Bio-polímero foto- responsivo sintetizado	Monier et al., 2018
<i>Thermotoga maritima</i>	-	Encapsulação	Fosfato de citrato 50 mM	pH 6,5 37°C	Influência do pH na microencapsulação	Estevinho et al., 2018

Fontes β -galactosidase	Suporte/Material	Método de imobilização	Tampão e Força iônica	pH ótimo e temperatura	Aplicação Biotecnológica	Referências
<i>Escherichia coli</i>	Microcapsulas vegetais revestidas com carboximetilpaquimarano-zeína	Aprisionamento/ Encapsulação	Fosfato de Potássio 10 mM	pH 7,4 37°C	Desempenho na Hidrólise da lactose	Deng et al., 2019
<i>Kluyveromyces lactis</i>	-	Encapsulação	Solução de PBS (solução salina tampão de fosfato) 500 mM	pH 7,0	Hidrólise do leite	Dong; Zhong 2019
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	Nanocristal de celulose bacteriana	Aprisionamento	-	pH 4,0-10 40°C	Hidrólise do leite	Tizchang et al., 2020
<i>Streptococcus lactis</i>	Nanopartículas de sílica	Aprisionamento	Acetato de sódio-ácido acético (ph 4,0-5,0), Fosfato de sódio (ph 6,0-8,0) NaOH - Glicina (ph 9,0)	pH 5,0 e 7,0 45°C	Imobilização, propriedades cinéticas	Mukundan et al., 2020
<i>Enterobacter aerogenes</i> KCTC2190	Matriz orgânica de ágar-ágar(Perolas)	Aprisionamento	400 mM Carbonato de sódio	pH 7,0 60°C	Produção e imobilização de β -galactosidase	Maity et al., 2021

Fonte: Elaborado pela autora (2022).

2.3.1.2.2 Adsorção física

A adsorção física é um método simples e de fácil aplicabilidade e de custo reduzido. Para a indústria, ao utilizar a imobilização de enzimas, é sempre preferível métodos que sejam facilmente aplicados e adaptados aos processos industriais e que sejam economicamente viáveis, com vantagem diferenciadora do biocatalisador em relação às enzimas solúveis (BASSO; SERBAN, 2019; JESIONOWSKI et al., 2014).

No método de adsorção física ocorrem ligações de hidrogênio, força de Van der Waals, interações eletrostáticas ou interações hidrofóbicas, adsorvidas em suportes, ou imobilizadas nos poros de materiais mesoporosos. Tal método é caracterizado por ser fácil e econômico, emprega condições amenas, minimizando os danos à enzima (AHMED et al., 2020; LUI et al., 2018; JESIONOWSKI et al., 2014).

Este método requer apenas que o adsorbato (substância adsorvida) e o adsorvente (material da adsorção) sejam colocados em contato com temperaturas brandas para a imobilização, desta forma a atividade da enzima imobilizada é freqüentemente preservada e o suporte pode ser regenerado. No entanto, devido às fracas interações entre a enzima e o suporte, a lixiviação da enzima para a solução pode ocorrer (KARAMI et al., 2020).

Para o método de adsorção com troca iônica, a grande vantagem é a viabilidade econômica, principalmente com o uso de resinas, que pode ser aplicado industrialmente por haver disponibilidade em grandes quantidades e devido à resistência do material. As resinas podem ser regeneradas com o uso de reagentes de baixo custo, de maneira que ao esgotar a enzima e atividade é muito baixa, o suporte pode ser regenerado *in situ* usando soluções como hidróxido de sódio (NaOH) e ácido clorídrico (HCl), o qual remove a enzima do suporte que novamente pode ocorrer o processo de imobilização (BOSSO; SERBAN, 2019).

Outro método é a imobilização por afinidade que visa explorar a especificidade da enzima em seu suporte através de diferentes condições fisiológicas, e pode ocorrer de duas maneiras, ou a enzima é conjugada a uma entidade que desenvolve afinidade para a matriz ou a matriz é pré-acoplada a um ligante de afinidade para a enzima alvo (REIS et al., 2019).

Esta imobilização por afinidade foi elucidada por Homaei et al. (2013), argumentado que a imobilização de enzimas por meio de ligação de afinidade é baseada na exploração da seletividade entre moléculas complementares, por exemplo, anticorpos e antígenos, íons metálicos, resultando na formação de catalisadores robustos, com menor possibilidade de lixiviação. Na Tabela 2.6 estão apresentados estudos que usaram a adsorção física como método de imobilização da enzima β -galactosidase.

Tabela 2. 6 – β -galactosidase de diversas fontes imobilizada pelo método de adsorção física.

Fonte da β -galactosidase	Suporte	pH ótimo e temperatura	Tampão e Força iônica	Aplicação Biotecnológica	Referências
<i>Kluyveromyces lactis</i>	Óxido de metal inorgânico	pH 7,0	TRIS	Uso em membranas de matriz mista	Satyawali et al., 2013
<i>Kluyveromyces lactis</i>	Microesferas de quitosana-hidroxiapatita ativada com glutaraldeído	pH 6,86	Tripolifosfato de sódio 23mM	Hidrólise da lactose	Cabuk et al., 2014
<i>Cicerarietinum</i>	Matriz de agarose funcionalizada com glutaraldeído (GFA)	pH 5,0 50°C	Fosfato de sódio 10 mM	Funcionalização da agarose via glutaraldeído para a imobilização	Satar e Ansari, 2015
<i>Aspergillus oryzae</i>	Nanopartículas magnéticas revestidas com quitosana com Tris (hidroximetil)	pH 6,0 25°C	Acetato de sódio 100 mM	Produção galacto-oligossacarídeos (GOS)	Chen et al., 2015
<i>Aspergillus oryzae</i>	Nanodiamante(nanopartículas de carbono cerca de 2–8 nm de diâmetro)	pH 4,5 50°C	Acetato de sódio 100 mM	Demonstrou a adsorção bioespecífica funcionalizados com glutaraldeído na hidrolise	Ansari et al., 2015
<i>Aspergillus oryzae</i>	Hidrogel enxertado com quitosana	pH 7,0 25°C	Fosfato de Potássio 100 mM	Hidrólise da lactose	Facin et al., 2015
<i>Aspergillus oryzae</i>	Purolite®A-109	pH 4,5 50 °C	Acetato de sódio, pH 4,0 Fosfato de sódio, pH 5,0	Produção galacto-oligossacarídeos (GOS)	Carevičet al., 2016
<i>Aspergillus oryzae</i>	Quitosana-genipina	pH 4,5 40°C	Acetato de sódio 100m M	Produção galacto-oligossacarídeos (GOS)	Klein et al., 2016
<i>Aspergillus oryzae</i>	Suportes heterofuncionais (amino-glioxil, carboxi-glioxil e quelato-glioxilagarose)	4°C	Bicarbonato 100 mM	Obtenção de Catalisadores ativos	Guerrero et al., 2017

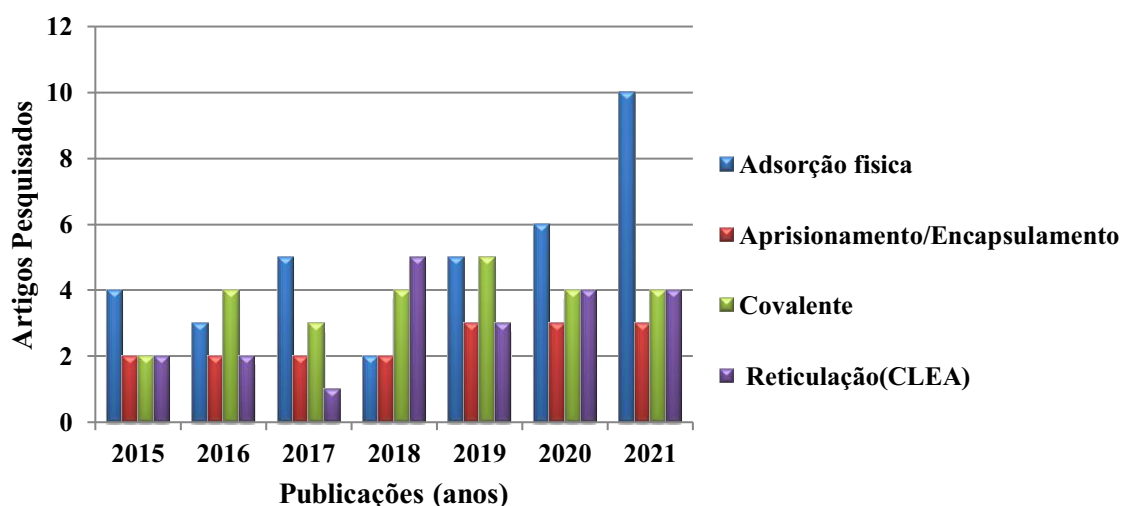
Fonte da β -galactosidase	Suporte	pH ótimo e temperatura	Tampão e Força iônica	Aplicação Biotecnológica	Referências
<i>Aspergillus oryzae</i>	Duolite® A 568	pH 4,5 25°C	Acetato de sódio 100 mM	Avaliação da estabilidade ao pH, temperatura e reutilização do novo biocatalizador	Falleiros et al., 2017
<i>Aspergillus oryzae</i>	Nanotubos de carbono de paredes múltiplas de polianilina cobalto (PANI / Co / MWCNTNC)	pH 4,5 25°C	Acetato de sódio 100 mM	Desenvolvimento do procedimento de alto rendimento para imobilização	Khan et al., 2017
<i>Aspergillus oryzae</i>	Pós de nanopartículas de TiO ₂ (Dióxido de titânio)	5.5 < pH < 8.5	Tampão McIlvaine 100 mM	Avaliar o impacto da adsorção enzimática em sua atividade catalítica	Márquez et al., 2017
<i>Lactobacillus acidophilus ATCC 4356</i>	Epoxy/butylmethacryla/ Octadecylmethacryla Amino/Estirenoquaternário/ Amino Estirenoquaternário/Amino C ₆ metacrilato/ Metacrilato de amino C ₂ / Amino C ₂ metacrilato	pH 6,8 50°C	Acetato de sódio 100 mM	Transgalactosilação	Carevic et al. , 2018
<i>Aspergillus oryzae</i>	Nanopartículas de prata	pH 7,5	Fosfato de Potássio 50 mM	Conversão de lactose em ácido glucônico	Arsalan et al., 2020
<i>Aspergillus oryzae</i>	Agarose de amônio quaternário	PH 6,0 30°C	Fosfato de Potássio 10 mM	Síntese de lactulose	Serey et al., 2020
<i>Aspergillus oryzae</i>	Nanoflores híbridos	pH 7,5 85°C	Midazol 20 mM, NaCl 500 mM e fosfato de sódio 20 mM	A morfologia, atividade e reciclabilidade testadas para hidrólise da lactose	Talens-Perales et al., 2020
<i>Bacillus circulans</i>	Grânulos de quitosana ativados com glutaraldeído	pH 6,0 50°C	Fosfato de sódio 100 mM	Produção galacto-oligossacarídeos (GOS)	Hackenhaar et al.,2021

Fonte da β-galactosidase	Suporte	pH ótimo e temperatura	Tampão e Força iônica	Aplicação Biotecnológica	Referências
<i>Aspergillus oryzae</i>	Biohidrogéis à base de pectina	pH 4,0 37°C	Acetato de sódio 100 m M	Hidrólise de lactose	Hanauer et al., 2021
<i>Kluyveromyces lactis</i>	Nanopartículas magnéticas de histidina (MNP-His)	pH 7,0 25°C	Tampão A (100 mM NaH ₂ PO ₄ , NaCl 500 mM e imidazol 20 mM)	Hidrólise da lactose de leite desnatado e soro de queijo	Andrade et al., 2021
<i>Kluyveromyces lactis</i>	Sílica mesoporosa / titânia com revestimento de quitosana.	pH 7,0 25°C	Fosfato de Potássio 100 mM	Suporte	Ricardi et al., 2021
<i>Aspergillus oryzae</i>	Tecido de algodão	pH 4,5	Tampão de ácido acético 100 mM	Produção galacto- oligossacarídeos (GOS)	Wang et al., 2021
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	Halloysite	pH 7,5 55°C	Fosfato de Potássio 100 mM	Os nanotubos de haloisita adsorveram a enzima e a matriz de nanocristais	Tizchang et al., 2021
<i>Aspergillus oryzae</i>	Goma arábica e hidrogéis à base de quitosana	pH 7,5 25°C	Fosfato de sódio 521,5 mM	Hidrólise da lactose padrão e hidrólise de lactose no leite UHT	Wolf et al., 2021
<i>Aspergillus oryzae</i>	Nanocompósito de óxido de grafeno reduzido (Ag @ rGO)	pH 4,5 37°C	Acetato de sódio 0,1M	Hidrólise de lactose	Shafi et al., 2021

Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Na figura 2.4 apresenta um levantamento da quantidade de pesquisas que foram publicadas para o método de adsorção física em vários bancos de dados na literatura científica concernentes utilizando a imobilização da enzima β -galactosidase entre 2015 e 2021 e demonstra a aplicação desta enzima. Destaca-se a imobilização por adsorção física com 35 publicações, seguido 26 para ligação covalente, 21 para a reticulação e 17 publicações para aprisionamento/ encapsulamento, sendo o método de adsorção física o mais reportado para imobilização nesta revisão.

Figura 2. 4 – Pesquisas relacionadas a β -galactosidase usadas no artigo nos últimos 6 anos (2015-2021), para os métodos de adsorção física, aprisionamento/encapsulamento, ligação covalente e reticulação (CLEA).



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

2.4 EQUILÍBRIO DE ADSORÇÃO

O conhecimento ou a determinação do equilíbrio de adsorção é geralmente um requisito essencial para obtenção de informações relevantes sobre projeto e análise de um processo por adsorção. As isotermas fornecem informações extremamente relevantes sobre o processo de adsorção, demonstrando o desempenho do equilíbrio do soluto que depende das espécies adsorvidas como o adsorbato, adsorvente e várias propriedades físicas da solução, como pH, força iônica e temperatura (YAN et al., 2017; RAGHAV; KUMAR, 2018).

A adsorção como um fenômeno de superfície geralmente tem um meio sólido poroso como o coração do processo, visto que fornece alto volume de microporos, no qual uma

mistura de fluido podendo ser líquido ou gás é atraído para a superfície sólida por ligações químicas ou físicas, levando a uma alta capacidade de adsorção (AL-GHOUTI; DA'ANA, 2020).

Muitas equações de isotermas relacionando a capacidade de carga de adsorbato com a concentração de adsorbato na corrente do processo a uma dada temperatura são formas mais comuns de expressar os dados de equilíbrio (RAY; DAS, 2020), foram propostas com dois ou mais parâmetros para ajustar os dados experimentais utilizando os valores de q_e , q_m , C_e , K_L . O q_e mostra a concentração de íons metálicos de equilíbrio no adsorvente (mg g^{-1}), q_m mostra a capacidade máxima de adsorção (mg g^{-1}), C_e é a concentração de adsorbato que é medida após agitação no tempo limite (mg L^{-1}), K_L representa a constante utilizada em cada modelo (L mg^{-1}). Alguns tipos de isotermas como de Langmuir, Freundlich, Dubinin-Radushkevich (D-R) e Temkin, que podem ser utilizados para a compreensão da relação e interação entre as moléculas de enzima e o suporte de imobilização que fornecem algumas respostas sobre o mecanismo de adsorção são demonstradas na Tabela 2.7 (KONG; ADIDHARMA, 2019).

Tabela 2. 7 – Alguns modelos de equilíbrio de adsorção como de Langmuir, Freundlich, Dubinin-Radushkevich (D-R) e Temkin.

Emprego	Modelo	Equação não linear	Referências
Modelos de adsorção química	Langmuir	$q_e = \frac{q_m K_L C_e}{1 + K_L C_e}$	Wang e Guo, 2020
O modelo descreve a 50% da fração de cobertura	Freundlich	$q_e = K_F C_e^{1/n}$	Mortazavi; Aghaei, 2020
Baseados na teoria do potencial de Polanyi	Dbinin-Radushkevich (D-R)	$q_e = q_m D - e^{-K_{DR} \epsilon^2}$	Chao et al., 2014
O modelo resume que a adsorção é um processo multicamadas	Temkin	$q_e = \frac{RT}{b} \ln(AC_e)$	Yan et al., 2017

Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Langmuir em 1932 propôs uma teoria para explicar a adsorção sobre uma superfície uniforme, simples, infinita e não porosa. Essa isoterma é baseada na suposição de cobertura em monocamada de adsorbato na superfície externa do adsorvente onde todos os locais de

adsorção são idênticos, estabelece a igualdade nas velocidades de adsorção e dessorção o que tem sido amplamente usado para descrever a adsorção de proteínas em adsorventes (WANG e GUO, 2020).

Daoud et al. (2010) pesquisaram cinética de adsorção da celulase de *Aspergillus niger* em um carvão ativado comercial. Os pesquisadores aplicaram os modelos de isotermas de adsorção de Langmuir e Freundlich para descrever as isotermas de equilíbrio com base na capacidade de adsorção e verificaram que modelo de Langmuir era mais adequado do que o modelo de Freundlich em diferentes temperaturas, pois a capacidade de adsorção aumentou quando a temperatura foi elevada, indicando assim que o processo de adsorção da celulase em carvão ativado comercial foi de natureza endotérmica.

Gürdas et al. (2011) determinaram as características de adsorção da β -galactosidase na resina Duolite A 568, analisando a isoterma de Langmuir e Freundlich para descrever o equilíbrio de adsorção. Em seus resultados concluíram que o modelo de Langmuir foi o que melhor se ajustou, confirmando que o Duolite A 568 foi favorável para adsorção da enzima β -galactosidase nas condições estudadas.

A isoterma de Freundlich é uma equação empírica que não se restringe à formação de monocamada, mas a adsorção de multicamadas. De acordo com a isoterma de Freundlich, a adsorção é favorecida a medida que os valores de $1/n$ forem menores que 1 indicando o grau de heterogeneidade da superfície ou intensidade de adsorção, ou seja valores de n na faixa $1 < n < 10$ indicam adsorção favorável (MORTAZAVI; AGHAEI, 2020).

A isoterma de Dubinin-Radushkevich (D-R) é usada para estimar a energia livre aparente de adsorção, bem como para fazer a diferença entre o processo de adsorção física e química. É utilizada a teoria do potencial de Polanyi, que assume o sistema de adsorção em que contém um “espaço de adsorção” onde as moléculas perdem energias potenciais. Estas energias potenciais são independentes da temperatura onde a maior energia potencial é alcançada nos poros ou fissuras dentro do adsorvente (CHAO et al., 2014; AL-GHOUTI; DA'ANA, 2020).

A isoterma de Temkin assume que a presença de interações indiretas entre o adsorbato e o adsorvente influenciará o calor de adsorção das moléculas adsorvidas na camada, que diminuirá linearmente com a cobertura do adsorbato, indicando que o processo de adsorção pode envolver quimissorção e fisissorção (YAN et al., 2017).

Gilani et al. (2016) investigaram a imobilização de lipase em grânulos de quitosana e grânulos de quitosana ativadas com glutaraldeído, avaliando os dados experimentais com uso das equações isotermas de adsorção de Langmuir, Freundlich, Hill, Sips, Temkin, Redlich-

Paterson e Dubinin- Radushkevich. A imobilização da lipase em grânulos de quitosana foi que melhor se ajustou aos dados experimentais utilizando a isoterma de Langmuir. No entanto, o modelo de isoterma de Freundlich correspondeu à imobilização de lipase em grânulos de quitosana ativados por glutaraldeído. E concluíram que a capacidade máxima de imobilização foi aumentada em 2 vezes, quando ao uso do glutaraldeído nos poros dos grânulos de quitosana. Esses resultados foram confirmados com modelos de isotermas de adsorção.

2.5 SUPORTES DE IMOBILIZAÇÃO

Na sessão anterior a interação entre enzima e suporte foi reportado no sentido de se obter informações específicas sobre a eficiência da adsorção ao se utilizar das isotermas. No entanto o material do suporte tem crucial importância no processo de imobilização quando se fala de métodos de imobilização, pois o mesmo pode permitir a estabilização da enzima quando em uso sucessivo sem perda de atividade (ZDARTA et al., 2018).

Na literatura são encontradas vastas pesquisas que utilizaram materiais sólidos para imobilizar enzimas e dentre os materiais destacam-se os orgânicos, como a quitosana, alginato, colágeno e gelatina, ágar e agarose, dextrano, amido, poliacrilamida, poliuretano, polipropileno e poliestireno e álcool polivinílico (PVA). Em materiais orgânicos, a imobilização de enzimas pode manter sua alta atividade, entretanto, tais materiais não apresentam estabilidade química e térmica suficientemente adequada para uso industrial (AN et al., 2015; PINHEIRO et al., 2019; KURAYAMA et al., 2019; KARIM et al., 202; EL-NAGGAR et al., 2021).

Os suportes inorgânicos incluem os cerâmicos (AN et al., 2015), titânio (RICARDI et al., 2021), zircônia (ŽIVKOVIĆ et al., 2015), alumina (ZHOU et al., 2019), sílica (HERNÁNDEZ-CORROTO et al., 2020; SNOCH et al., 2019), terra diatomácea (celite) (DASH; BANERJEE, 2021), carvão ativado (CHATTERJEE et al., 2016), resinas acrílicas (FENG et al., 2019) e grafeno (ADEEL et al., 2018; WU et al., 2017).

Entre estes materiais inorgânicos, os cerâmicos possuem vida útil relativamente mais prolongada, permitem controle do tamanho dos poros durante a fabricação, podem ser usados em muitas conformações diferentes e são relativamente mais baratos (SIGURDARDÓTTIR et al., 2018).

Os materiais cerâmicos são compostos por: aluminos silicatos (caulinita, bentonita, montmorilonita, entre outros); óxidos (sílica, alumina, titânia, zircônia, etc.); nitretos

(alumínio e nitretos de silício) e carbonetos tais como carbonetos de silício e boro. Os materiais cerâmicos são utilizados juntamente com aditivos adequados como aglutinantes, surfactantes, plastificantes, solventes, fundentes, entre outros, facilitando a montagem dos processos de imobilização com objetivo de melhorar as características desejadas dos produtos finais (ZHOU et al., 2019).

A sílica (SiO_2), um óxido cerâmico, é o material inorgânico mais utilizado em imobilização de enzimas, pois possui baixo custo, disponibilidade e fácil controle do tamanho dos poros (YAN et al., 2017).

No processo de imobilização da enzima, o material cerâmico pode ser implementado diretamente como um material puro, ou então pode ser adicionada como um aditivo às membranas, resultando em misturas de compósitos cerâmicos que podem ser encontrados na forma de membranas (BARRIOS-ESTRADA et al., 2018), pó (JAQUISH et al., 2018), espumas (BILAL et al., 2019) e microesferas (REN et al., 2020).

Os nanomateriais estão agora em tendência para a imobilização enzimática utilizando diferentes enzimas que é um material que pode ter qualquer dimensão externa em nanoescala ou com estrutura interna ou estrutura de superfície em escala nanométrica (TIELAS et al., 2014).

2.5.1 Nanomateriais

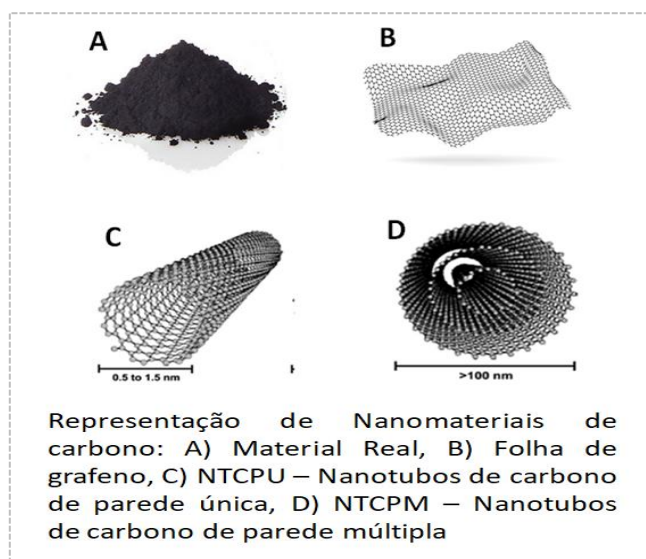
Tais materiais, tanto de origem orgânica como inorgânica, são caracterizados por uma excepcional estabilidade térmica e química e possui excelentes propriedades mecânicas. Ademais, esses materiais de suporte são produzidos em várias formas morfológicas com tamanhos de partículas controláveis, possuindo vários grupos funcionais, correspondentes aos grupos químicos das proteínas, que aumentam a ligação enzimática e a modificação de superfície (ZDARTA et al., 2018).

O exemplo desses nanomateriais funcionais tem-se os nano-bioconjugados (NBCs), nanofibras (NF), nanotubos (NTs), nanopartículas (NPs), nanocompósitos (NCs), e nanoflores (NFs), com propriedades e estruturas únicas (MISSION et al., 2014).

Atualmente os suportes de imobilização que estão atraindo interesse significativo são os nanotubos de carbono (NTCs), devido à combinação única de várias propriedades como alta condutividade térmica e elétrica, alta resistência mecânica, grandes proporções, alta área superficial, características ópticas distintas tornando-os adequados para uma ampla gama de aplicações (VENKATARAMAN et al., 2019).

Estes nanotubos de carbono (NTCs) (Figura 2.5) são tubos circulares em nanoescala consistindo em um arranjo hexagonal de átomos de carbono hibridizados, formados por folhas de grafeno, podendo ser de uma ou várias camadas enroladas em torno do eixo central em um ângulo específico de rotação, e que podem ser divididos em nanotubos de carbono de parede única (NTCPUs), que é um cilindro sem costura em apenas uma camada de grafeno, e nanotubos de carbono de parede múltipla (NTCPMs) de forma cilíndrica, com várias camadas concêntricas de grafeno (XU et al., 2020; KUJAWA et al., 2021).

Figura 2. 5 – Nanomateriais de carbono, folha de grafeno, nanotubos de parede única e dupla utilizados em imobilização enzimática.



Fonte: Adaptado de RIBEIRO et al.(2017).

A imobilização de enzimas em nanotubos de carbono pode ocorrer por diferentes mecanismos tais como: adsorção por interações de Van der Waals, interações hidrofóbicas entre aminoácidos com cadeias laterais juntamente com superfície dos NTCs; ligação anfifílica gerando uma interação tipo surfactante; interações eletrostáticas, nas quais tanto o ponto isoelétrico da enzima quanto o ponto de carga zero dos NTCs desempenham um papel; e ligações de hidrogênio entre grupos terminais de amina de enzimas e grupos contendo oxigênio em NTCs oxidados (TAVARES et al., 2015; DAGYS et al., 2017; WEI et al., 2015; VERMA et al., 2013).

O método de adsorção física utilizado em nanomateriais tem sido o método mais simples e de reduzido custo de processamento, sendo que uma boa interação depende da superfície química dos nanomateriais conjugados, dos tipos de aminoácidos que estão

presentes nas enzimas, preservação da atividade catalítica, bem como estrutura tridimensional da enzima. Porém, uma desvantagem da adsorção física ou ligação iônica está relacionada à dessorção da enzima do nanosuporte podendo ser ocasionada por fatores como pH, força iônica, temperatura e aditivos, e também após vários usos do nanobiocatalisador (CIPOLATTI et al., 2016; ZDARTA et al., 2018).

Outro tipo mecanismo de imobilização para suporte nanoestruturado é o encapsulamento. No entanto em uma nova abordagem que são os denominados *nanoscaffolds*, que são polímeros naturais usados na produção de estruturas que podem hospedar moléculas de enzimas posicionadas com controle preciso sobre as distâncias espaciais, e permite melhorar o transporte de massa do substrato (ELLIS et al., 2020).

Fu et al. (2016) relataram em seus protocolos a contagem de complexos multienzimáticos de DNA, ou seja, descreveram protocolos para a montagem robusta, purificação e caracterização de complexos multienzimáticos organizados por *nanoscaffolds* de DNA e obtiveram sucesso para desenvolver uma série de complexos de enzimas artificiais com a difusão facilitada do substrato inter enzimático.

A imobilização covalente em nanomateriais vem ocupando um espaço expressivo no campo da imobilização, porque este se baseia na formação de ligações químicas estáveis entre enzima e o nanocarreador e, por esse motivo, a existência de grupos químicos (por exemplo, grupos amina, carboxila, hidroxila, epóxi, etc.) na superfície dos nanomateriais é obrigatória para possível conjugação com a enzima. Existem alguns protocolos tradicionalmente estabelecidos para possibilitar a imobilização por ligação covalente como: ativação de epóxi, ativação de amino com glutaraldeído, ativação de hidroxila com brometo de cianogênio e acoplamento de carbodiimida de grupos carboxila, seguida pela subsequente ligação a grupos fenólicos ou amino das enzimas (PATILA et al., 2017; AHMAD; SARDAR, 2015).

2.5.1.1 Nanomateriais inorgânicos

Os nanomateriais inorgânicos apresentam grande disponibilidade e são de fácil preparo, com procedimentos simples e materiais de baixo custo, e de excelente estabilidade térmica e propriedades mecânicas, bem como resistência microbiana, e de modificações do diâmetro do volume dos poros, o qual resulta no desenvolvimento de diferentes suportes para imobilização enzimática que tornam seu uso viável em diversas aplicações como dispositivos neuro-implantáveis (FABBRO et al., 2011), imagiologia e tratamento do câncer (WANG et al., 2020)

A tecnologia da sílica em nanomateriais, com diferentes funcionalidades e tamanhos de superfície, tem efeito que facilita sua funcionalização ao uso de diferentes agente modificadores, tais como: (3-aminopropil) trietoxissilano (APTES), álcool polivinílico ou polietileno glicol (PEG), possibilitando assim, a ocorrência de ligações covalentes das enzimas ao nanosuporte (ZDARTA et al., 2018).

Outra categoria de suportes inorgânicos que são utilizados na imobilização de enzima por não necessitarem de purificação e podem ser encontrados em abundância na natureza é o grupo de minerais de nanorgila, como aloisita, laponita, caulinita, bentonita, sepiolita e montmorilonita, que se destacam na morfologia e apresentam algumas propriedades especiais tais como área de superfície, alta permutabilidade iônica e capacidade de inchamento (MOHAMED et al., 2017).

Os nanomateriais à base de óxidos de metal estão numa das subcategorias mais abundantes de nanomateriais inorgânicos que estão sendo usados para imobilização de enzimas, devido ao fato de existir vários metais em diferentes estados de oxidação para servirem como nanosportes. O titânio, zircônia, alumina, óxido de zinco e nanotubos de ouro são os óxidos metálicos mais estudados para imobilização de enzimas devido a boa capacidade de sorção, a habilidade de permanecer inerte sob diferentes condições de reação, resistência mecânica e alta estabilidade térmica, juntamente com a presença de grupos hidroxila abundantes em sua superfície, tornando-os hidrofílicos e aumentando a formação de ligações estáveis entre os nanosportes e enzimas (WU et al., 2017; MISSON et al., 2015).

Jin et al.(2015) imobilizaram a lactase em várias nanofibras de polímeros (nanofibra de polianilina (PANI), nanofibra de polianilina magneticamente separável (PAMP), fibra de celulose DEAE magneticamente separável (DEAE), fibra de celulose CM magneticamente separável (CM) e nanofibra de poliestireno (PSNF) para estabilização e reuso. Estes pesquisadores relataram que o PSNF-Gal dobrou o rendimento de GOS comparado ao usando da enzima livre, o que é importante para o processo de bioengenharia. A maior quantidade de GOS foi obtida a 400 g/L de lactose. Com atividade considerável, reciclabilidade e produtividade, o PSNF-Gal foi comprovado como sendo um biocatalisador econômico e robusto para aplicações de bioprocessamento contínuo.

As nanopartículas magnéticas (NPMs), também referidas como óxido de ferro estruturados como maghemita (γ -FeO) e magnetita (FeO), são conhecidos por seu pequeno tamanho, grande área de superfície, alta biocompatibilidade e baixa toxicidade, características que os tornam nanotransportadores adequados e resultam em alta capacidade de carregamento da enzima, além do mais, têm a capacidade de transformar a energia eletromagnética de um

campo externo de alta frequência em calor, devido às perdas derivadas da reversão da magnetização (KHOABI et al., 2015; YADAV et al., 2019).

Del Arco et al. (2021) destacaram as tendências recentes na aplicação de biocatalisadores magnéticos de médio a alto porte em diferentes áreas tais como: produção de biodiesel, indústrias alimentícias e farmacêuticas, purificação de proteínas ou remoção de contaminantes ambientais, e concluíram que os biocatalisadores magnéticos permitem fácil recuperação e simplificam o processamento operacional, podem ser aplicados com sucesso em muitas áreas industriais, e além disso, a resposta magnética pode ser usada para regular a atividade enzimática e a agitação no biorreator.

Outro interessante trabalho utilizando nanopartículas foi realizado por Cui et al. (2018) para detecção de bactérias patogênicas em água com nanopartículas magnéticas com revestimento com β -galactosidase, com o objetivo de obter um sistema simples, colorimétrico, econômico e de alto rendimento baseado em um complexo de óxido de ferro/enzima carregado positivamente para a detecção de bactérias gram-positivas e gram-negativas em águas. Os resultados demonstraram que devido a alta sensibilidade da β -galactosidase conseguiram a detecção de *E. coli* gram-negativa e *S. aureus* gram-positiva, e desta forma foi demonstrado uma possível estratégia eficaz para a identificação de contaminação causada por patógenos em água potável.

2.5.1.2 Nanomateriais orgânicos

A aplicação da nanotecnologia aos sistemas biológicos tem se expandido rapidamente pelos seus excelentes efeitos na melhoria da estabilidade da enzima e no refinamento dos métodos de imobilização (ANSARI; HUSAIN, 2012). As nanopartículas biológicas são partículas que variam de 10 nm a 1 μ m de tamanho e podem ser derivadas de biomoléculas ou compostos orgânicos, divididos em quatro categorias principais: proteínas, ácidos nucleicos, lipídios e polissacarídeos. A forte atividade de adsorção juntamente a alta eficiência catalítica das nanopartículas as tornam fortes candidatas para uma imobilização enzimática eficiente (ARSALAN et al., 2020; KUMAR; LAL, 2014).

As nanopartículas biológicas podem ser formuladas a partir de fitas de ácidos nucleicos de DNA e RNA. Essas biomoléculas podem ser projetadas para formar nano-andaimes tridimensionais com capacidade única de se automontar em estruturas compactas e estáveis, permitindo o controle preciso sobre o tamanho, geometria e composição das nanopartículas (PANIGAJ; REISER, 2016; NADAR; RATHOD, 2018; LI et al., 2015).

Outro tipo de formulação de nanopartículas biológicas seria as de base lipídicas, que incluem lipossomas, nanoemulsões, nanopartículas de lipídios sólidos e carreadores de lipídios nanoestruturados, apresentando estabilidade de armazenamento, possibilitando aumento de escala (de laboratorial para escala industrial) sem complicações, além de possuir capacidade de direcionar e aprisionar compostos com solubilidade diferente (SAALLAH; LENGGORO, 2018; COSTA et al., 2021).

Temoçin et al. (2017) imobilizaram peroxidase em membrana de nanofibra de poli(acrilamida (álcool vinílico) que foi utilizada para conversão de fenol. Sampaio et al. (2016) imobilizaram a lacase em membranas de nanocelulose bacteriana com o objetivo de identificar as propriedades antibacterianas da lacase adequadas para curativos. Os resultados mostram claramente o efeito antimicrobiano da lacase em bactérias gram-positivas (92%) e gram-negativas (26%) e citotoxicidade aceitável para aplicações de curativos.

Bayazidi et al. (2018) imobilizaram a lisozima em nanofibras de celulose bacteriana em busca de suas características antimicrobiana e propriedades morfológicas. Na literatura se obtém vastas revisões que mostram os nanomateriais à base de polímeros orgânicos, que são caracterizados por diferentes formas, tamanhos e propriedades e podem ser facilmente utilizados para a imobilização de enzimas e geralmente levam à melhoria na estabilidade de armazenamento de biocatalisadores (ZAHIRINEJAD et al., 2021; MAHMOUDPOUR et al., 2021; LING et al., 2016; JAFARY et al., 2016; ALSHANBERI et al., 2021).

2.5.1.3 Nanomateriais híbridos

Nanomateriais híbridos podem melhorar substancialmente os parâmetros cinéticos e termodinâmicos das enzimas imobilizadas (ALTINKAYNAK et al., 2016). Estes nanomateriais possuem dois ou mais componentes diferentes e propriedades ativas de elementos orgânicos e inorgânicos, com incríveis resultados na área de embalagens de alimentos, proteção de plantas, eletroquímica e várias aplicações adicionais nos setores ambientais e agroalimentar (BALASUBRAMANIAN; JAWAHAR, 2019).

Os componentes inorgânicos dos nanomateriais híbridos podem ser os íons metálicos, aglomerados ou partículas metálicas, sais, óxidos, sulfetos, elementos não metálicos e seus derivados, etc., e os componentes orgânicos como os grupos ou moléculas orgânicas, ligantes, biomoléculas, substâncias farmacêuticas, polímeros, etc. (ANANIKOV, 2019).

Nanomateriais inorgânicos híbridos são encontrados como estruturas metal-orgânicas (MOFs), construídas pela coordenação de um cátion, ou cluster metálico, e um ligante

orgânico, resultando na formação de uma rede porosa 2D ou 3D com alta área de superfície e cristalinidade, ocasionando tamanhos e volumes dos poros diferentes. Desta maneira, enzimas podem ser imobilizadas em MOFs de três maneiras diferentes: (i) adsorção física ou ligação covalente na superfície, (ii) encapsulamento dentro da estrutura e (iii) difusão nos poros (HU et al., 2018).

Recentes pesquisas em imobilizações enzimáticas com uso da β -galactosidase têm sido realizadas utilizando, por exemplo, os nanomateriais orgânico-inorgânicos híbridos como em nanoflores híbridas orgânico-inorgânicas. Essas nanoflores foram descobertas como precipitado azul, assemelhando-se a uma estrutura de flor, com mecanismo de formação (auto-montagem) dessas nanoflores híbridas orgânico-inorgânicas ocorrendo em três etapas: nucleação, crescimento e conclusão (Al-Maqdi et al., 2021).

Talens-Perales et al. (2020) imobilizaram a β -galactosidase termoestável (TmLac), e a eficiência de incorporação da enzima nas nanoflores que foi superior a 95% para uma concentração de proteína de $0,05 \text{ mg mL}^{-1}$, e que também apresentaram as melhores propriedades para hidrólise da lactose em leite. Fabra et al. (2020) imobilizaram a enzima termoestável β -galactosidase (TmLac) de *Thermotoga maritima* incorporada em formato de nanoflores que foi usado para avaliar a capacidade das matrizes de hidrogel para preservar a atividade hidrolítica da enzima e a reutilização. Os aerogéis à base de ágar comercial exibiram estabilidade e alta atividade catalítica (ou seja, 0,5 g de cápsulas de aerogel hidrolisou o equivalente de lactose de 100 mL de leite em 15 min).

Outro interessante trabalho foi desenvolvido por Wang et al. (2019) que descreveram a construção do híbrido orgânico-inorgânico flores de RNA (hRNFs) que são estruturas altamente adaptativas com controle de tamanhos, sequências específicas de ácidos nucleicos e uma estrutura altamente porosa. Demonstraram que hRNFs são aplicáveis como potenciais plataformas biológicas, onde o andaime hRNF podem ser projetados para funcionalização de superfícies. Estes hRNFs pós-funcionalizados permitem a conjugação fácil com várias biomoléculas e nanomateriais, ou seja, proteínas, enzimas, corantes orgânicos, nanopartículas inorgânicas. Os autores em particular mostraram que hRNFs podem servir como andaimes macios para β -galactosidase na imobilização podendo aumentar muito a atividade enzimática e a estabilidade.

Alguns trabalhos que abordam a imobilização de β -galactosidase bem como de diferentes fontes, em nanomateriais são apresentados na Tabela 2.8.

Tabela 2. 8 – β -galactosidase imobilizada em nanomateriais de diferentes fontes.

Fonte de β -galactosidase	Nanopartículas usadas para imobilização	Método de imobilização	Resultados	Aplicações biotecnológicas	Referência
<i>Agaricusbis porus</i>	Nanofibra de polianilina (PANI), Nanofibra de polianilina magneticamente separável (PAMP), Fibra de celulose DEAE magneticamente separável (DEAE), Fibra de celulose CM magneticamente separável (CM) e nanofibra de poliestireno (PSNF)	Adsorção	Com exceção de CM e PSNF, a PANI-, PAMP- e DEAE-lactase mostraram porcentagem de conversão (100%, 47% e 12%),	Hidrólise de lactose	Lin et al., 2015
<i>Aspergillus oryzae</i>	Nanopartículas de quitosana (Fe_3O_4)	Adsorção	Apresentou rendimento de 59%	Bioconversão de lactose em galacto-oligossacarídeos (GOS)	Misson et al., 2015
<i>Aspergillus oryzae</i>	Nanopartículas de prata (AgNPs)	Adsorção	Produziu galacto-oligossacarídeos em temperaturas mais altas (50 °C e 60 °C)	Investigação de carboxilação	Ansari et al., 2015
<i>Aspergillus oryzae</i>	Nanopartículas magnéticas de Fe_3O_4 revestidas com quitosana	Adsorção	Rendimento máximo de GOS de 50,5%	Bioconversão de lactose em galacto-oligossacarídeos (GOS)	Chen e Duan, 2015
<i>Aspergillus oryzae</i>	Nanocompósitos de óxido de grafeno-ferro	Adsorção	A avaliação de genotoxicidade revelou toxicidade insignificante para pBR322plasmídeo de DNA e linfócitos humanos.	Biossensores para utilização em laticínios para produtos sem lactose e aplicações catalisadas por enzimas em grande escala	Khan et al. 2016
<i>Aspergillus oryzae</i>	Nanopartículas de diatomita	Ligação covalente	Biocatalisadores magnéticos com	Matriz para imobilização de	Cabrera et al.,

Fonte de β -galactosidase	Nanopartículas usadas para imobilização	Método de imobilização	Resultados	Aplicações biotecnológicas	Referência
	magnética revestidas com polianilina	usando glutaraldeído	~60% de atividade residual após 10 ciclos	enzimas	2018
<i>Aspergillus aculeatus</i>	Nanopartículas magnéticas revestidas com quitosana ativadas com glutaraldeído.	Covalente	Rendimento máximo de galactoligosacarídeos foi de 17% mol/mol em 36 h	Atividades hidrolítica e de trans-galactosilação	Nguyen et al., 2019
<i>Kluyveromyces fragilis</i>	Nanopartículas de ouro (AuNPs)	Covalente	pH ótimo de 7,0 e temperatura ótimo a 40 °C	Modificação de Superfície com álcool polivinílico (PVA)	Alshanberi et al., 2021
<i>Kluyveromyces fragilis</i>	Nanopartículas de óxido de zinco (ZnONPs) e nanotubos de carbono de parede múltipla (MWNTCs)	Ligação covalente usando glutaraldeído	MWNTCs exibiram melhor desempenho do que ZnONPs na detecção de bactérias	Método sensível para monitorar <i>E. coli</i>	Meraat et al., 2020
<i>Aspergillus oryzae</i>	Nanopartículas de prata estabilizadas com ácido tânico (AgNPs)	Ligação covalente	83,6% de rendimento de imobilização, reteve quase 60% de sua atividade após o décimo uso sucessivo	Hidrólise de lactose	Arsalan et al., 2020

Fonte: Elaborado pela autora (2022).

2.6 REATORES UTILIZADOS

Os principais componentes de um sistema enzimático imobilizado são: a enzima, o suporte e o método de fixação da enzima a este suporte, em que as características deste suportedeterminam o desempenho do sistema enzimático imobilizado (BRENA et al., 2013).

Na forma imobilizada, a enzima tem a vantagem de ser utilizada tanto em operações descontínuas quanto contínuas (HOMAEI, 2016). Quanto da escolha do reator a ser usado com enzimas imobilizadas estão disponíveis diferentes opções, como exemplo: reator de leito fixo, reator de leito fluidizado e reator agitado (VASILEVA et al., 2016).

Nos últimos dez anos houve uma fase de intenso uso de novas reações enzimáticas em reatores tubulares para a síntese contínua de produtos químicos de alto valor agregado em escala de bancada. Porém, a transição para a implementação em escala industrial exige o enfrentamento de novos desafios relacionados ao biocatalisador e ao reator (TAMBORINI et al., 2018).

Estes desafios se relacionam a novas abordagens, protocolos, ferramentas e estratégias altamente inovadoras para minimizar a lacuna entre a pesquisa e a indústria e entre o laboratório e a escala de fabricação em tamanho real, a um novo nível de compreensão dos mecanismos de reação e fenômenos de transporte em microescala, juntamente com ferramentas computacionais e micros sensores avançados para otimizar e controlar bioprocessos (WOHLGEMUTH et al., 2015).

Observa-se que nem todos os protocolos de imobilização tornam as enzimas altamente ativas e estáveis, porém pode ser alcançado por meio do controle do processo de imobilização que deve ser tanto no nível molecular (interface entre a enzima e suporte) quanto no nível do sistema (interface entre o material biocatalítico e a configuração do reator) (THOMPSON et al., 2018; LINDEQUE et al., 2019).

Na indústria de alimentos, a β -galactosidase imobilizada tem sido amplamente aplicada em reatores como em sistemas de reator de membrana (MBR), reatores de leito fluidizado (FBRs), reatores de fibra oca (HFRs), reatores de leito fixo (PBRs) e reatores de tanque agitado (STRs) (NAFEES et al., 2021).

Comercialmente, a hidrólise da lactose é realizada no modo de operação batelada em reatores de tanque agitado, empregando-se β -galactosidase livre ou imobilizada em batelada tradicional, sendo um processo simples e de fácil controle (HUSAIN, 2019).

Em reatores descontínuos Ansari et al. (2014) avaliaram a imobilização de β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* em membrana de acetato-polimetilmetacrilato de celulose

(CA-PMMA) e sua aplicação na hidrólise de lactose em reatores descontínuos a 50°C. Em seus resultados a atividade preservada da enzima livre e imobilizada foi de 45% e 83%, respectivamente, após cinco semanas de armazenamento a 4°C, e concluíram que o Acetato-polimetilmetacrilato de celulose pode provar ser uma matriz importante para imobilizar outras enzimas industrialmente.

Ubilla et al. (2020) estudaram a síntese de lactulose em reator de tanque agitado continuamente com β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* imobilizada em suporte monofuncional de glicoxil agarose e, nos resultados, 76% da lactose reagida correspondeu à transgalactosilação e 24% à hidrólise.

Guerrero et al. (2015) imobilizaram β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* na forma de agregados reticulados (CLAGs) operando em batelada repetida. Os pesquisadores concluíram que a operação permitiu um significativo aumento na produção de lactulose por unidade de massa de biocatalisador e na produtividade cumulativa, inclusive as CLAGs melhoraram significativamente a síntese de lactulose, reduzindo o gasto de utilização de novas enzimas. Os melhores resultados foram obtidos com 5,5g de glutaraldeído/g enzima em 5h de reticulação, obtendo uma atividade específica de 15.000 UIg⁻¹, com 30% de rendimento de imobilização.

Outro reator utilizado em imobilização é o reator de membrana (MBR). Neste reator o biocatalisador é confinado em uma região bem definida do espaço por meio de uma membrana seletiva, sendo imobilizado por adsorção ou por aprisionamento dentro da própria membrana (CHAKRABORTY et al., 2014).

Este tipo de reator, operando em sistemas contínuos para hidrólise da lactose em leite integral ou soro de queijo, demonstra ser eficaz tanto na conversão de lactose quanto na recuperação de proteínas, podendo ser realizadas em apenas uma única etapa (SCHULZ; RIZVI, 2021).

Os riscos no reator de membrana (MBR) estão relacionados a contaminação microbiana e entupimento das membranas de ultrafiltração, devido à alta carga de proteínas a exemplo o leite. Estes problemas podem ser resolvidos operando o sistema em temperaturas relativamente altas ou pelo uso substratos desproteïnados, como por exemplo, o permeado de soro de leite (SCHULZ; RIZVI, 2021).

Outra abordagem para solucionar o problema do uso das membranas seria a utilização contínua e a separação simultânea de produtos da mistura de reação utilizando para isto um reator de reciclagem de membrana contínua operando em três etapas: hidrólise, ultrafiltração e reciclagem da enzima (CAO et al., 2020).

Vasileva et al. (2016), imobilizaram β -galactosidase covalentemente em uma membrana de polipropileno modificada, utilizando glutaraldeído na ligação covalente, em um biorreator com membrana em espiral, com o objetivo produzir xarope de glicose-galactose a partir de soro de leite residual. Os resultados foram comparados com os resultados recebidos por uma enzima livre. Os pesquisadores obtiveram resultados após 10h, o grau de hidrólise da lactose aumentou para 91% e após o 20º ciclo, o rendimento do biorreator foi de 69,7%.

Outros reatores são os denominados reatores de leito fixo (PBRs), as enzimas imobilizadas estão localizadas em um leito fixo que consistem em um feixe de alguns milhares de tubos longos e estreitos posicionados verticalmente dentro de um recipiente, neste tipo de reator os possíveis danos causados ao biocatalisador são minimizados devido ao menor cisalhamento em relação aos reatores de leito fluidizado. Porém pode ocorrer a possibilidade de compactação do leito e formação de caminhos preferenciais, limitando a transferência de massa e calor (SEN et al., 2014).

Os reatores de leito fixo (PBRs) têm sido amplamente utilizados para a hidrólise da lactose por β -galactosidase imobilizada, e nesta configuração de reator a vantagem é de uma taxa de reação mais elevada em comparação com os reatores de tanque agitado contínuo (SCHULZ; RIZVI, 2021).

Pesquisas foram feitas utilizando este reator, como relatado por Rodriguez-Colinas et al. (2016), que imobilizaram a β -galactosidase de *Bacillus circulans* covalentemente ligada a grânulos de agarose ativados por aldeído e testada para a produção contínua de galacto-oligossacarídeos (GOS) em um reator de leito fixo (PBR). Os pesquisadores obtiveram um biocatalisador que mostrou estabilidade operacional em 14 ciclos sucessivos de reação, com características e cada uso de 20 minutos à 45°C, representando um avanço na produção contínua de GOS empregando reatores de leito fixo com β -galactosidases imobilizadas.

Nos reatores de leito fluidizado (FBRs), o biocatalisador imobilizado é mantido em suspensão pela recirculação do ar ou da solução do substrato no sistema com a entrada no fundo do reator, proporcionando a livre circulação das partículas por todo o leito, evitando a decantação dos biocatalisadores na parte inferior do reator. Desta forma o uso desse tipo de reator evita a formação de caminhos preferenciais e a transferência de massa são facilitadas. No entanto, estes reatores fluidizados podem suportar quantidades menores de biocatalisador por unidade de volume do reator do que os reatores de leito fixo, reduzindo a eficiência geral do reator por unidade de volume, tornando o processo em grande escala mais difícil (HOMAEI, 2016; NARAYANAN et al., 2014).

Dal Magro et al. (2021) estudaram a clarificação de sucos de frutas utilizando coquetel de enzimas constituído por pectinase (PE), poligalacturonase (PG), pectinliase (PL), pectina metil esterase (PME) e celulase total (CE) imobilizadas em grânulos de quitosana ativados com glutaraldeído em reatores de leito fixo e leito fluidizado.

Em outro estudo Fischer et al. (2013) pesquisaram a otimização e modelagem da hidrólise da lactose em um sistema de leito fixo. Foi empregado β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* imobilizada com combinação dos métodos adsorção e reticulação (com glutaraldeído) na resina de troca iônica Duolite A 568. Os pesquisadores identificaram um padrão de fluxo não ideal com a formação de um fluxo de *bypass* no reator de leito fixo que resultou em uma conversão de apenas 65%. Tão logo para resolver o problema os pesquisadores utilizaram dois reatores de leito fixo em série, aumentando a conversão em 82%. Desta forma demonstraram que o estudo de reatores em série foi de fundamental importância para a viabilizar a aplicação de enzimas nos processos de hidrólise.

Guerrero et al. (2019) pesquisaram a síntese de lactulose a partir de frutose e lactose em operação contínua de reator de leito fixo utilizando a β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* imobilizada com glioxil-agarose. Nos resultados, o rendimento de oligossacarídeos transgalactosilados foi de $0,16 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$ e a conversão de lactose foi de 28%.

2.7 ESTABILIDADE DA ENZIMA IMOBILIZADA

A imobilização de enzimas tornou-se um instrumento valioso na utilização de enzimas livres e desta forma, após a imobilização, há um microambiente favorável em torno das moléculas da enzima (RUEDA et al., 2016). Este microambiente favorável criado ao redor das moléculas de enzimas poderá mitigar efeitos deletérios de um meio de reação drástico, por exemplo: altas concentrações de sais, pH e temperaturas elevadas (BARBOSA et al., 2015).

Outro fato importante na estabilidade enzimática durante a imobilização está relacionado aos suportes poroso com a fixação da enzima na parede porosa, se ocorrer mais rápido haverá distribuição homogênea, se a fusão for mais lenta do que a taxa da imobilização as enzimas se juntarão formando uma coroa na seção externa dos poros de suporte, este efeito foi relatado por Bolivar et al. (2011). Estes autores estudaram por microscopia confocal de varredura a laser a distribuição de duas proteínas fluorescentes, marcadas com poli-histidina, (His-GFP e His-mCherry FP) imobilizadas em diferentes suportes do tipo agarose reticulados, e provaram o conceito de que a localização de proteínas em superfícies porosas pode ser controlada pelo ajuste da taxa de imobilização de proteínas. Os pesquisadores concluíram que

as enzimas podem reagir de forma bastante diferente em função de sua distribuição dentro de uma superfície porosa, houve essa percepção analisando a alteração de três variáveis: natureza da interação físico-química entre a superfície do suporte e proteína, a densidade desses grupos reativos e a competição no processo de imobilização.

Kao et al. (2014) pesquisaram sobre o aumento da atividade e estabilidade da lisozima imobilizada em nanopartículas de sílica mesoporosa, ou seja, os pesquisadores empregaram a sílica mesoporosa de tamanhos de poros diferentes para confinar a lisozima a fim de imitar a enzima em um microambiente, e nos resultados relataram que a estabilidade e atividade catalítica dependem criticamente do tamanho dos poros e da curvatura da superfície.

2.7.1 pH, força iônica, temperatura e aditivos nas imobilizações

Ao utilizar reatores em imobilizações há grande dificuldade na aplicação de enzimas em escalas industriais pelas características de desnaturação quando usadas em ambientes mais complexos, dada a sensibilidade a altas temperaturas, altas pressões, pHs extremos, detergentes e solventes orgânicos e em qualquer destas variações as enzimas podem se tornar inativas (CHAPMAN et al., 2018)

2.7.1.1 Efeito do pH

A atividade da enzima é dependente do pH eo gradiente de pH gerado no biocatalisador durante a reação pode afetar significativamente a eficiência catalítica. Para melhorar a eficiência catalítica das enzimas imobilizadas formadoras de prótons, uma estratégia útil é co-imobilizar enzimas que consomem prótons na mesma matriz, a fim de regular o pH do microambiente(MERAAT et al., 2020).

A estabilidade da enzima pode aumentar ou diminuir devido à imobilização ao uso de gradientes em diferente pH, caso a reação produza ou consuma H^+ , é possível que o valor de pH externo do meio também não seja como o pH dentro da partícula, pois esses valores de pH sendo muito altos ou muito baixos podem contribuir para as alterações na conformação da enzima, que possivelmente pode acarretar perda na atividade enzimática (BONIELLO et al., 2012).

A enzima imobilizada pode exibir uma mudança no pH ótimo dependendo dos efeitos da carga superficial no microambiente local, como observado por Liu et al.(2012) que demonstraram a imobilização de β -galactosidase de *Klyveromyces fragilis* sendo esta

significativamente dependente do pH de 6,0 a 9,0. Cabuk et al. (2014) estudaram a enzima β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* em quitosana-hidroxiapatita e analisaram os efeitos dos parâmetros de imobilização, incluindo pH do meio. A enzima imobilizada exibiu notável alargamento em pH com melhor termoestabilidade e maior estabilidade em pH 5,0 e valores de pH superiores (pH 9,0). A imobilização também resultou em um deslocamento de 0,5 unidades em pH ótimo para atividade enzimática máxima de 81,8%.

A atividade das enzimas depende estritamente do pH, a enzima é razoavelmente estável em pH ideal, portanto é necessário estudar/determinar o pH ótimo para o desempenho dos ensaios de imobilização. Tal efeito foi relatado por Celik et al. (2016) que imobilizaram covalentemente a β -glicosidase em quitosana em nanotubos de carbono, com o pH ótimo em 6,0 para a enzima livre, que foi mudado para pH 5 após imobilização. Das et al. (2014) também relataram uma mudança no pH ótimo, de 4,5 para a enzima livre para um pH de 6,5 após a imobilização de β -glicosidase por aprisionamento em grânulos de alginato.

Enquanto a enzima é estável dentro da faixa de seu pH ideal, valores de pH mais extremos, em ambas as direções (ácidos ou básicos), promovem alterações na estrutura terciária da enzima de maneira irreversível. Este processo é dependente do tempo e depende do pH efetivo, quanto mais ele se desvia do pH ideal, mais rápida é a inativação (SUN et al., 2017).

A exemplo, Sass e Jördening (2020) imobilizaram β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* em nanofibras de gelatina para a produção de galacto-oligossacarídeos. Em seus resultados relataram que o pH também exerceu grande influência na atividade específica de β -galactosidase imobilizada e como resposta houve o aumento constante na atividade específica até pH 7,5 com uma forte queda subsequente para 0,15% em pH 8,5, perfil contrário ao perfil de pH de β -gal livre onde 50% da enzima já estava inativada em pH 7,5.

2.7.1.2 Efeito da força iônica

Os tampões servem para ajustar e estabilizar o pH desejado durante o ensaio enzimático, consistindo basicamente em um ácido fraco e um componente básico forte. Além da faixa de pH apropriada para os tampões, outros critérios devem ser considerados por exemplo a concentração e a natureza dos componentes do tampão. Quanto mais concentrado for um sistema tampão, maior será sua capacidade de estabilizar o pH (BISSWANGER, 2014).

Os componentes do tampão podem ter influências estabilizadoras ou desestabilizadoras na estrutura da proteína. A faixa dos tampões é estreita, se uma faixa mais ampla for necessária, por exemplo, para analisar a dependência do pH de uma enzima, vários sistemas de tampões podem ser combinados, como por exemplo o tampão Teorell – Stenhagen e o tampão Britton – Robinson, consistindo em mais de dois componentes e que conseguem cobrir uma faixa de pH mais ampla (MERAAT et al., 2020).

Os íons influenciam a atividade enzimática tanto por meio de sua força iônica quanto por sua natureza, exemplo disso é que a atividade de uma enzima pode diferir consideravelmente quando testada em dois sistemas tampão diferentes, mesmo que compartilhem o mesmo pH e concentração (SHAHRESTANI et al., 2016).

A exemplo de pesquisa sobre a influência de tampão foi relatado por Djalal et al. (2019) estudaram a influência do tampão utilizado na suspensão da enzima imobilizada para purificação de xarope de glicose em um sistema em batelada. Duas soluções tampão foram avaliadas (tampão acetato e tampão fosfato). Os resultados mostraram que o valor equivalente de dextrose (DE amostra xarope de glicose) foi maior a partir do primeiro uso do tampão fosfato que foi de 56,645% e o menor foi do quinto uso de tampões de acetato que foi de 33,55%.

2.7.1.3 Efeito da temperatura

A dependência da atividade das enzimas com a temperatura assemelha-se em alguns aspectos à dependência do pH, aumentando com o aumento da temperatura, passando por um máximo, seguido por uma diminuição. A velocidade de qualquer reação química aumenta com a temperatura, de acordo com uma regra empírica, duas a três vezes a cada 10°C. Isso vale também para as reações enzimáticas. Por outro lado, a estrutura tridimensional das enzimas é termossensível e torna-se desestabilizada em altas temperaturas, causando a desnaturação (MANGIAGALLI; LOTTI, 2021).

Bosso et al. (2016) avaliaram a atividade de β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* e de *Aspergillus oryzae* na hidrólise de leite UHT e leite desnatado em diferentes concentrações de enzimas, temperatura e pH. Os pesquisadores observaram diferenças significativas em relação a atividade enzimática de β -galactosidase, de ambas as fontes, na hidrólise da lactose. As maiores atividades foram observadas à 40°C e pH 7,0 para β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis*, e a 55°C e pH 5,0 para β -galactosidase de *Aspergillus oryzae*. Porém, em relação à estabilidade térmica, observou-se que a enzima de *Aspergillus oryzae* apresentou

maior resistência ao calor quando em comparação com a β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis*.

De fato, a termoestabilidade é a capacidade de uma enzima resistir a desnaturação térmica. Várias enzimas termofílicas mostram uma estabilidade notável em altas temperaturas, enquanto outras são instáveis em preparações puras e obviamente precisam da capacidade de estabilização dos componentes celulares. Acer e Matpan Bekler (2021) avaliaram a enzima β -galactosidase altamente estável termicamente produzida por *Anoxybacillus sp.*, sendo que a enzima purificada apresentava retenção de 71% da atividade enzimática à 60°C.

2.7.1.4 Efeitos de aditivos

Algumas misturas de aditivos podem ser classificadas como substratos e ligantes que são pequenas moléculas orgânicas não carregadas específicas, espécies iônicas não específicas e polímeros que podem melhorar a estabilidade da enzima imobilizada (LEIBLY et al., 2012).

Fernandez-Lopez et al. (2015) relataram que o efeito de um aditivo na estabilidade da enzima deve ser considerado uma característica intrínseca e que depende do protocolo de imobilização. Estes autores pesquisaram o efeito de cátions na estabilidade de lipases imobilizadas, e concluíram que o uso de 5 mM de sais contendo Mn^{2+} ou Ca^{2+} podem ser usados para o aumento na estabilidade da enzima em meio aquoso.

Neste universo pode ser citado também o glicerol, que é um composto capaz de estabilizar algumas enzimas e que foi relatado por Braham et al. (2021), que estudaram o efeito do glicerol em diferentes concentrações e valores de pH de 13 enzimas imobilizadas, inclusive β -galactosidase de *Aspergillus oryzae*. Nos resultados para β -galactosidase o glicerol não produziu efeitos significativos em pH 5,0 nem 7,0. Estes pesquisadores concluíram que, por mais que o glicerol seja considerado um aditivo que estabiliza a maioria das enzimas estudadas, não pode ser considerado como um agente estabilizador universal, porque de acordo com os resultados os efeitos são fortemente dependentes do valor do pH e do protocolo de imobilização e da natureza da enzima imobilizada.

2.8 APLICAÇÃO DA ENZIMA B-GALACTOSIDASE IMOBILIZADA

A β -galactosidase possui excelente potencial catalítico que tem sido explorada como uma das mais importantes enzimas industriais para a obtenção de produtos sem lactose nas

indústrias de laticínios, galacto-oligosacarídeos (GOS) e oligossacarídeos produzidos que são prebióticos e que aumentam o crescimento de bifidobactérias lactobacilosno intestino grosso e são incluídos como ingredientes alimentares para reduzir o crescimento de microrganismos patogênicos, produzindo efeitos benéficos para a saúde humana (CARNEIRO et al., 2018).

Tais produtos sem lactose são direcionados a uma proporção significativa da população que são intolerantes à lactose, tal intolerância ocorre quando o intestino delgado não produz enzima lactase o suficiente para digerir a lactose, que metaboliza a lactose presente em laticínios (ALSHANBERI et al., 2021).

De sorte que na tecnologia alimentar, a β -galactosidase tem sido aplicada para diminuir as concentrações de lactose de produtos lácteos e aumentara cremosidade, digestibilidade de produtos como, por exemplo: cremes de soro de leite, leite condensado e sorvete, que contêm maior quantidade de lactose e desta forma estão mais suscetíveis a formação de uma textura arenosa como resultado da cristalização da lactose (WONG; HARTE, 2014).

Em relação a aplicação da β -galactosidase na preservação do meio ambiente, o soro de leite é um subproduto natural da produção de alimentos, em grandes quantidades, pode representar um risco ao meio ambiente se não for gerenciado adequadamente, pois em esgotos resulta no bloqueio dos processos biológico de estações de tratamento de águas residuais aumentado demanda bioquímica de oxigênio – DBO e demanda química de oxigênio – DQO, se é descartado no solo, afeta características físico-químicas que resultam na diminuição da produtividade das culturas, se for descartado em corpos de água, reduz o oxigênio dissolvido, dificultando a biodegradabilidade representando um grande risco para a vida aquática e para o meio ambiente (BALDASSO et al., 2011; KOLEV SLAVOV, 2017).

O soro de queijo pode ser utilizado como alternativa na redução de resíduos, como obtenção de bebidas tipo “whey”, suco de frutas adicionado de soro de queijo, e em bebidas com baixo teor alcoólico como a cerveja de soro, vinho e champanhe, também, pode ser usado para a fabricação de ricota, manteiga de soro, sorvete de soro, e também as proteínas do soro podem ser utilizadas como emulsionantes, gelificantes/aglutinantes (PANESAR et al., 2010).

Uma outra alternativa promissora ao uso do soro de queijo relatado por Macwan et al. (2016) seria aplicações como meio de cultivo durante a fermentação de microrganismos que consomem a lactose já que é fonte abundante de carbono.

A exemplo You et al. (2017) utilizaram o soro em pó como substrato de baixo custo para a produção de β -galactosidase como produto principal e etanol como subproduto foram investigadas. Como resultado obtiveram o produto de β -galactosidase com 5,15U/mg da proteção da goma acácia por secagem por pulverização. Além disso, o subproduto etanol com 31,08% (v/v) foi obtido após a permeabilização.

Outra abordagem ao uso da β -galactosidase está na projeção de biossensores, sendo a imobilização de enzimas na superfície do transdutor uma etapa importante e decisiva. O exemplo disto biossensores de β -galactosidase tem sido usado com alta taxa de resposta, excelentes no limite de detecção, sendo então uma tecnologia inovadora devido ao fato de se buscar máxima utilidade pelo controle dos alguns defeitos observados nos biossensores mais antigos (FOUROU et al., 2016; GU et al., 2016; Yao et al., 2021).

A exemplo Sharma e Leblanc (2017) realizaram um estudo comparativo sobre os biossensores de β -galactosidase reportados nas obras da literatura científica. Foi indicado que o uso do biossensor de β -galactosidase para medição da lactose tem sido útil na identificação de vacas / búfalos que estão sofrendo da mastite, porque o leite desses animais tem baixo teor de lactose. Relatou-se ainda que biossensores de β -galactosidase têm aplicação no tratamento de águas residuais, uma vez que a lactose é um parâmetro importante nas águas residuais. E clinicamente, foi indicado que o biossensor de β -galactosidase é importante para determinação do nível de lactose em sangue, porque uma quantidade excessiva de lactose no sangue pode revelar malignidade gastrointestinal.

A β -galactosidase está sendo usada como um biomarcador de senescência celular reportado por Xiao et al.(2018) que avaliaram, através de revisão bibliográfica, vários indicadores de detecção comumente usados na senescência celular, inclusive associados à β -galactosidase. Os autores compararam a precisão, credibilidade, especificidade e o escopo das aplicações potenciais e forneceram uma visão geral dos avanços recentes nos métodos de detecção.

Outra aplicação da β -galactosidase na obtenção de biocombustíveis foi relatado por Beniwal et al. (2018), que pesquisaram uma nova estratégia de produção de etanol. A β -galactosidase foi imobilizada em nanopartículas à base de dióxido de silício para a hidrólise da lactose do soro de leite, em seguida consideraram as abordagens disponíveis para a bioconversão eficiente do soro hidrolisado em etanol. A estratégia de co-imobilização usando *Saccharomyces cerevisiae* e *Kluyveromyces marxianus* foram utilizadas para fermentação. Os pesquisadores observaram que a principal observação do processo de fermentação foi que um alto título de etanol de 63,9 g L⁻¹ foi produzido usando 150 g L⁻¹ de lactose concentrada.

Outra aplicação para β -galactosidase está na síntese de tagatose, um adoçante com 92% de doçura comparada a sacarose, mesmo sendo obtido a partir da lactose, que possui apenas 16% do poder adoçante da sacarose. Este adoçante tem apenas 38% das calorias da sacarose, com a vantagem de se ter um índice glicêmico muito mais baixo. Em 2014, a Inalco (empresa de serviço e distribuição de produtos da Itália), relatou um processo para fabricação de tagatose usando β -galactosidase imobilizada em resina de troca iônica. Neste processo foi proposto a recuperação e valorização da lactose contida no soro de leite. A tagatose pôde ser obtida por hidrólise preliminar da lactose, em que a glicose é removida por desglicosilação subsequente com obtenção da tagatose pela epimerização de galactose (CHINI et al., 2014; JAYAMUTHUNAGAI et al., 2017).

2.9 CONSIDERAÇÕES FINAIS E TENDÊNCIAS FUTURAS

A β -galactosidase é uma enzima de altíssimo valor e com aplicações em vários setores para produção de laticínios sem lactose, síntese de compostos de alto valor agregado (GOS, lactulose), obtenção de biossensor, na preservação ambiental reduzindo os impactos associados aos resíduos da indústria de laticínios e também na hidrólise da lactose para produção de biocombustível.

No entanto, existem ainda grandes desafios e maiores esforços a serem realizados no sentido de se utilizar desta enzima para produzir um biocatalisador com alta atividade enzimática e principalmente uma excelente estabilidade a fim de ser aplicada em larga escala ao projeto de biorreatores e condições industriais, devido a perda de atividade da enzima imobilizada no que diz respeito ao microambiente desfavorável comparado a forma (livre) solúvel.

Desta forma, com o avanço dos estudos atuais em nanomateriais sendo tendência para a imobilização de diferentes enzimas devido às suas propriedades físico-químicas exclusivas como por exemplo os nano-bioconjugados (NBCs), nanofibras (NF), nanotubos (NTs), nanopartículas (NPs), nanocompósitos (NCs), e nanoflores (NFs), ou materiais cerâmicos como aluminos silicatos (caulinita, montmorilonita, bentonita, entre outros); óxidos (sílica, alumina, titânia, zircônia), que podem ser utilizados como suportes combinados aos métodos de imobilização que poderão contribuir para a obtenção de β -galactosidase imobilizada com alta estabilidade e atividade, como biocatalisador viável em maior escala de produção inclusive ser promissor para as diversas aplicações industriais.

REFERÊNCIAS

- ABADA, E. A. Application of Microbial Enzymes in the Dairy Industry. *Enzymes in Food Biotechnology*, p. 61-72. 2019. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813280-7.00005-0>
- ABURTO, C.; GUERRERO, C.; VERA, C.; WILSON, L.; ILLANES, A. Co-immobilized β -galactosidase and *Saccharomyces cerevisiae* cells for the simultaneous synthesis and purification of galacto-oligosaccharides. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 118, p. 102-108. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2018.08.003>
- ACER, O.; MATPAN BEKLER, F. Characterization of a Thermally Stable β -galactosidase Produced by Thermophilic *Anoxybacillus* sp. AH1. *Turkish Journal of Nature and Science*, v. 10, n. 1, p. 130-136. 2021. <https://doi.org/10.46810/tdfd.835632>
- ADEEL, M.; BILAL, M.; RASHEED, T.; SHARMA, A.; IQBAL, H. M. N. Graphene and graphene oxide: Functionalization and nano-bio-catalytic system for enzyme immobilization and biotechnological perspective. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 120, p. 1430-1440. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.09.144>
- ADHIKARI (NEE PRAMANIK), S. Application of Immobilized Enzymes in the Food Industry. *Enzymes in Food Biotechnology*, p. 711-721. 2019. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813280-7.00041-4>
- ADIGÜZEL, A. O.; TUNÇER, M. Production, Characterization and Application of a *Xylanase* from *Streptomyces* sp. AOA 40 in Fruit Juice and Bakery Industries. *Food Biotechnology*, v. 30, n. 3, p. 189-218, 2016. <https://doi.org/10.1080/08905436.2016.1199383>
- AL-GHOUTI, M. A.; DA'ANA, D. A. Diretrizes para o uso e interpretação de modelos de isoterma de adsorção: uma revisão. *Journal of Hazardous Materials*, 393, 122383. 2020.
- AL-MAQDI, K. A.; BILAL, M.; ALZAMLY, A.; IQBAL, H. M. N.; SHAH, I.; ASHRAF, S. S. Enzyme-Loaded Flower-Shaped Nanomaterials: A Versatile Platform with Biosensing, Biocatalytic, and Environmental Promise. *Nanomaterials*, v. 11, n. 6, p. 1460. 2021. <https://doi.org/10.3390/nano11061460>
- AHMAD, R.; SARDAR, M. Enzyme Immobilization: An Overview on Nanoparticles as Immobilization Matrix. *Biochemistry & Analytical Biochemistry*, v. 4, n. 2. 2015.
- AHMED, S. A.; ABDELLA, M. A. A.; EL-SHERBINY, G. M.; IBRAHIM, A. M.; EL-SHAMY, A. R.; ATALLA, S. M. M.; HASSAN, M. E. Catalytic, kinetic and the rmal properties of free and immobilized *Bacillus subtilis* -MK1 α -amylase on chitosan-magnetic nanoparticles. *Biotechnology Reports*, v. 26, p. e00443. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00443>
- ALSHANBERI, A. M.; AL-SHAERI, M. A.; ANSARI, S. A. Overviewing the Application

of β -Galactosidase "Immobilized on Nanoparticles" in Dairy Industries. *Arquivos Brasileiros de Biologia e Tecnologia*, v. 64, p. e21180747. 2021.

<https://doi.org/10.1590/1678-4324-2021180747>

ALTINKAYNAK, C.; TAVLASOGLU, S.; YZDEMIR, N.; OCSOY, I. A new generation approach in enzyme immobilization: Organic-inorganic hybrid nanoflowers with enhanced catalytic activity and stability. *Enzyme and Microbial Technology*, p. 93-94, p. 105-112. 2016.

<https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2016.06.011>

AN, N.; ZHOU, C. H.; ZHUANG, X. Y.; TONG, D. S.; YU, W. H. Immobilization of enzymes on clay minerals for biocatalysts and biosensors. *Applied Clay Science*, n.114, p. 283-296. 2015.

<https://doi.org/10.1016/j.clay.2015.05.029>

ANDRADE, B. C.; GENNARI, A.; RENARD, G.; NERVIS, B. D. R.; BENVENUTTI, E. V.; COSTA, T. M. H.; VOLKEN DE SOUZA, C. F. Synthesis of magnetic nanoparticles functionalized with histidine and nickel to immobilize His-tagged enzymes using β -galactosidase as a model. *International Journal of Biological Macromolecules*, 184, 159-169. 2021.

<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.06.060>

ANISHA, G. S. β -Galactosidases. *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering*, p. 395-421. 2017.

<https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63662-1.00017-8>

ANSARI, S. A.; SATAR, R.; ZAIDI, S. K.; NASEER, M. I.; KARIM, S. 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>

ANSARI, S. A.; SATAR, R.; KASHIF ZAIDI, S.; AHMAD, A. Immobilization of *Aspergillus oryzae* β -Galactosidase on Cellulose Acetate-Polymethylmethacrylate Membrane and Its Application in Hydrolysis of Lactose from Milk and Whey. *International Scholarly Research Notices*, p. 1-6. 2014.

<https://doi.org/10.1155/2014/163987>

ANSARI, S.A.; HUSAIN, Q. Potential applications of enzymes immobilized in/in nanomaterials: a review. *Biotechnol. Adv.* v. 30, n. 3, p. 512 - 523. 2012.

<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.09.005>

PMid:21963605

ANANIKOV, V. P. Organic-Inorganic Hybrid Nanomaterials. *Nanomaterials*, v. 9, n.9, 1197. 2019.

<https://doi.org/10.3390/nano9091197>

ARAUJO, L. R. Processamento e qualidade dos produtos com baixo teor de lactose. 2017. 43 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Química) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.

ARAYA, E.; URRUTIA, P.; ROMERO, O.; ILLANES, A.; WILSON, L. Design of combined crosslinked enzyme aggregates (combi-CLEAs) of β -galactosidase and glucose

isomerase for the one-pot production of fructose syrup from lactose. Food Chemistry. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.02.024>

ARGENTA, A. B.; NOGUEIRA, A.; SCHEER, A.P. Hydrolysis of whey lactose: *Kluyveromyces lactis* β -galactosidase immobilisation and integrated process hydrolysis-ultrafiltration. International Dairy Journal, v. 117, p. 105007. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2021.105007>

ARNAU, J.; YAVER, D., HJORT, C. M. Strategies and Challenges for the Development of Industrial Enzymes Using Fungal Cell Factories. In: Nevalainen H. (eds) Grand Challenges in Fungal Biotechnology. Grand Challenges in Biology and Biotechnology. Springer, Cham. 2021. https://doi.org/10.1007/978-3-030-29541-7_7

ARSALAN, A.; ALAM, M. F.; FARHEEN ZOFAIR, S. F.; AHMAD, S.; YOUNUS, H. Immobilization of β -galactosidase on tannic acid stabilized silver nanoparticles: A safer way towards its industrial application. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, v. 226, p. 117637. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2019.117637>

BALASUBRAMANIAN, M., JAWAHAR, P. Rubber-CNT nanocomposites. In: Aliofkhaezai, M. (Ed.), Advances in Nanostructured Composites: Vol. 1: Carbon Nanotube and Graphene Composites. CRC Press, p. 295. 2019. <https://doi.org/10.1201/9781315118406-13>

BALDASSO, C.; BARROS, T. C.; TESSARO, I. C. Concentration and purification of whey proteins by ultrafiltration. Desalination, v. 278, p. 1-3, p. 381-386. 2011. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2011.05.055>

BARBOSA, O.; ORTIZ, C.; BERENQUER-MURCIA, Á.; TORRES, R. C.; RODRIGUES, FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Strategies for One-Step Immobilization Purification of Enzymes as Industrial Biocatalysts Biotechnol. Adv., v. 33, p. 435 - 456. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.03.006>

BARRIOS-ESTRADA, C.; ROSTRO-ALANIS, M. J., PARRA, A. L.; BELLEVILLE, M.-P.; SANCHEZ-MARCANO, J.; IQBAL, H. M. N.; PARRA-SALDÍVAR, R. Potentialities of active membranes with immobilized laccase for Bisphenol A degradation. International Journal of Biological Macromolecules, n. 108, p. 837-844. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.10.177>

BASSO, A.; SERBAN, S. Industrial applications of immobilized enzymes - A review. Molecular Catalysis, v. 479, p. 110607. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.mcat.2019.110607>

BAYAZIDI, P.; ALMASI, H.; AK ASL, A. K. Lysozyme immobilization on bacterial cellulose nanofibers: characteristics, antimicrobial activity and morphological properties Int. J. Biol. Macromol., v. 107, p. 2544 - 2551. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.10.137>

BAYAZIDI, P.; ALMASI, H.; ASL, A. K. Immobilization of lysozyme on bacterial

cellulose nanofibers: Characteristics, antimicrobial activity and morphological properties. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 107, p. 2544-2551. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.10.137>

BENAVENTE, R.; PESSELA, B.; CUIEL, J.; LAS RIVAS, B.; MUÑOZ, R.; GUISÁN, J.; CORZO, N. Improving Properties of a Novel β -Galactosidase from *Lactobacillus plantarum* by Covalent Immobilization. *Molecules*, v. 20, n. 5, p.7874-7889. 2015. <https://doi.org/10.3390/molecules20057874>

BENIWAL, A.; SAINI, P.; KOKKILIGADDA, A.; VIJ, S. Use of silicon dioxide nanoparticles for β -galactosidase immobilization and modulated ethanol production by co-immobilized *K. marxianus* and *S. cerevisiae* in deproteinized cheese whey. *LWT - Food Science and Technology*, v. 87, p. 553-561. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.09.028>

BEYLER-ÇIGIL, A.; DANIS, O.; SARSAR, O.; KAHRAMAN, M. V.; OGAN, A.; DEMIR, S. Optimizing the immobilization conditions of β -galactosidase on UV-cured epoxy-based polymeric film using response surface methodology. *Journal of Food Biochemistry*, v. 45, n. 4. 2021. <https://doi.org/10.1111/jfbc.13699>

BILAL, M.; ASGHER, M.; CHENG, H.; YAN, Y.; IQBAL H. M. N. Multipoint enzyme immobilization, surface chemistry and new platforms: a paradigm shift in biocatalyst design. *Crit. Rev. Biotechnol.*, v. 39, p. 202-219. 2019. <https://doi.org/10.1080/07388551.2018.1531822>

BILAL, M.; IQBAL, H. M. N. Naturally-derived biopolymers: Potential platforms for enzyme immobilization. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.02.152>

BISSWANGER, H. Enzyme assays. *Perspectives in Science*, v. 1, p. 41-55, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.pisc.2014.02.005>

BIRÓ, E. One-pot biocatalytic conversion of lactose to gluconic acid and galacto-oligosaccharides using immobilized β -galactosidase and glucose oxidase. *Catalysis Today*, v. 366, p. 202-211. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.cattod.2020.06.090>

BOLIVAR, J. M.; HIDALGO, A.; SÁNCHEZ-RUILOBA, L.; BERENGUER, J.; GUISÁN, J. M.; LÓPEZ-GALLEGO, F. Modulation of the distribution of small proteins within porous matrixes by smart-control of the immobilization rate. *Journal of Biotechnology*, v. 155, n. 4, p. 412-420. 2011. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2011.07.039>

BONIELLO, C.; MAYR, T.; BOLIVAR, J. M.; NIDETZKY, B. Dual-lifetime referencing (DLR): a powerful method for on-line measurement of internal pH in carrier-bound immobilized biocatalysts. *BMC Biotechnology*, v.12, n. 1, p. 11. 2012. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-12-11>

BOSSO, A.; MORIOKA, L. R. I.; SANTOS, L. F., SUGUIMOTO, H. H. Lactose hydrolysis

potential and thermal stability of commercial β -galactosidase in UHT and skimmed milk. *Food Science and Technology*, v. 36, n.1, p. 159-165. 2016..

<https://doi.org/10.1590/1678-457X.0085>

BRAHAM, S. A.; SIAR, E. H.; ARANA-PEÑA, S.; BAVANDI, H.; CARBALLARES, D.; MORELLON-STERLING, R.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Positive effect of glycerol on the stability of immobilized enzymes: Is it a universal fact? *Process Biochemistry*, v. 102, p. 108-121. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.12.015>

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Resolução nº 430, de 13 de maio de 2011. Conselho Nacional do Meio Ambiente CONAMA. Dispõe sobre condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução nº 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 16 maio 2011. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=646>>

BRENA, B.; GONZÁLEZ-POMBO, P.; BATISTA-VIERA, F. Immobilization of Enzymes: A Literature Survey. *Immobilization of Enzymes and Cells*, 15-31. 2013.

https://doi.org/10.1007/978-1-62703-550-7_2

BRUNO-BARCENA, J. M., AZCARATE-PERIL, M. A. Galacto-oligosaccharides and colorectal cancer: Feeding our intestinal probiome. *Journal of Functional Foods*, v. 12, p. 92-108. 2015. DOI:10.1016/j.jff.2014.10.029. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.10.029>

CABRERA, M. P.; FONSECA, T. F.; SOUZA, R. V. B.; ASSIS, C. R. D.; QUISPE MARCATOMA, J.; MACIEL, J. DA C.; CARVALHO, L. B. Polyaniline-coated magnetic diatomite nanoparticles as a matrix for immobilizing enzymes. *Applied Surface Science*, v. 457, p. 21-29. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2018.06.238>

CABUK, B.; TARI, C.; HARSA, S. T. Immobilization of β -galactosidase in the chitosan-hydroxyapatite complex: effects of immobilization conditions. *J Nutr Health Food Eng.*, v. 1, n. 1, p. 13-23. 2014. <https://doi.org/10.15406/jnhfe.2014.01.00004>

CAO, T.; PÁZMÁNDI, M.; GALAMBOS, I.; KOVÁCS, Z. Continuous Production of Galacto-Oligosaccharides by an Enzyme Membrane Reactor Utilizing Free Enzymes Membranes, v. 10, n. 9, p. 203. 2020. <https://doi.org/10.3390/membranes10090203>

CARDELLE-COBAS, A.; OLANO, A.; IRAZOQUI, G.; GIACOMINI, C.; BATISTA-VIERA, F.; CORZO, N.; CORZO-MARTÍNEZ, M. Synthesis of Oligosaccharides Derived from Lactulose (OsLu) Using Soluble and Immobilized *Aspergillus oryzae* β -Galactosidase. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, v. 4. 2016.

<https://doi.org/10.3389/fbioe.2016.00021>

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

CAREVIC, M.; M. VUKASINOVIC-SEKULIC, M.; COROVI, M.; ROGNIAUX, D. C. H.;

ROPARTZ, D.; VELICKOVIC, D.; BEZBRADICA, D. Evaluation of b-galactosidase from *Lactobacillus acidophilus* as biocatalyst for galacto-oligosaccharides synthesis: Product structural characterization and enzyme immobilization. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 126, n. 6, p. 697-704. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2018.06.003>

CARNEIRO, L. A. B. C.; YU, L.; DUPREE, P.; WARD, R. J. Characterization of a β -galactosidase from *Bacillus subtilis* with transgalactosylation activity. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 120, p. 279-287. 2018. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2018.07. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.07.116>

CELIK, A.; DINCER, A.; AYDEMIR, T. Characterization of beta-glucosidase immobilized on chitosan-multiwalled carbon nanotubes (MWNTCS) and their application on tea extracts for aroma enhancement. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 89, p. 406-414. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.05.008>

CHAKRABORTY, S.; RUSLI, H.; NATH, A.; SIKDER, J.; BHATTACHARJEE, C.; CURCIO, S.; DRIOLI, E. Immobilized biocatalytic process development and potential application in membrane separation: a review. *Critical Reviews in Biotechnology*, v. 36, n. 1, p. 43-58. 2014. <https://doi.org/10.3109/07388551.2014.923373>

CHAO, Y.; ZHU, W.; WU, X.; HOU, F.; XUN, S.; WU, P.; LI, H. Application of graphene-like layered molybdenum disulfide and its excellent adsorption behavior for doxycycline antibiotic. *Chemical Engineering Journal*, v. 243, p. 60-67. 2014. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2013.12.048>

CHAPMAN, J., ISMAIL, A.; DINU, C. Industrial Applications of Enzymes: Recent Advances, Techniques, and Outlooks. *Catalysts*, v. 8, n. 6, p. 238. 2018. <https://doi.org/10.3390/catal8060238>

CHATTERJEE, S.; BASU, S.; DUTTA, S.; CHATTARAJ, R.; BANERJEE, D.; SINHA, S. Removal and recovery of lead(II) and chromium(VI) by bromelain immobilized on activated charcoal. *Materials Today: Proceedings*, v. 3, n. 10, p. 3258-3268. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2016.10.007>

CHEN, S. C.; DUAN, K. J. Production of Galactooligosaccharides Using β -Galactosidase Immobilized on Chitosan-Coated Magnetic Nanoparticles with Tris (hydroxymethyl) phosphine as an Optional Coupling Agent. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 16, n. 12, p. 12499-12512. 2015. <https://doi.org/10.3390/ijms160612499>

CHINI, B. J.; FEBBRUARI, M.; MATULLI, L.; VAGNOLI. Enzymes immobilized on styrene-divinyl benzene matrix and the use disso in industrial productions., WO2014 / 006606 A1, 2014.

CHURAKOVA, E.; PERI, K.; VIS, J. S.; SMITH, D. W.; BEAM, J. M.; IJVERBERG, M. P.; STOR, M. C.; WINTER, R. T. Accurate analysis of residual lactose in low-lactose milk: Comparing a variety of analytical techniques. *International Dairy Journal*, v. 96, P. 126-131.

2019. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2019.02.020>

CIPOLATTI, E. P.; VALÉRIO, A.; HENRIQUES, R.O.; MORITZ, D. E.; J.L. NINOW, J. L.; FREIRE, D. M. G.; MANOEL, E. A.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; OLIVEIRA, D. Nanomaterials for biocatalyst immobilization-state of the art and future trends. RSC Adv., v.6, p. 104675-104692. 2016. <https://doi.org/10.1039/C6RA22047A>

COLE, L.; KRAMER, P. R. Macronutrients. Human Physiology, Biochemistry and Basic Medicine, p. 157-164. 2016. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803699-0.00005-0>

COSTA, C. P.; MOREIRA, J. N.; LOBO, J. M. S.; SILVA, A. C. Intranasal delivery of nanostructured lipid carriers, solid lipid nanoparticles and nanoemulsions: A current overview of in vivo studies. Acta Pharmaceutica Sinica B, v. 11, n. 4, p. 925-940.2021. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2021.02.012>

CUI, J. D.; JIA, S. R. Optimization protocols and improved strategies of cross-linked enzyme aggregates technology: current development and future challenges. Critical Reviews in Biotechnology, v. 35, n.1, p.15-28. 2013. <https://doi.org/10.3109/07388551.2013.795516>

CUI, M.; CHANG, H.; ZHONG, Y.; WANG, M.; WU, T.; HU, X.; XU, C. Detection of Bacteria in Water with β -Galactosidase-Coated Magnetic Nanoparticles. SLAS TECHNOLOGY: Translating Life Sciences Innovation, 247263031877340. 2018. <https://doi.org/10.1177/2472630318773407>

DAGYS, M.; LAURYNĖNAS, A.; RATAUTAS, D.; KULYS, J.; VIDŽIŪNAITĖ, R.; TALAIKIS, M.; SHLEEV, S. Oxygen electroreduction catalysed by laccase wired to gold nanoparticles via the trinuclear copper cluster. Energy & Environmental Science, v. 10, n. 2, p. 498-502. 2017. <https://doi.org/10.1039/C6EE02232D>

DAHARI, R. F.; ONGKUDON, C. M.; MISSON, M. Effect of Crosslinkers on Immobilization of β -Galactosidase on Polymethacrylate Monolith. Transactions on Science and Technology, v. 5, n. 2, p. 106 - 113, 2018.

DAL MAGRO, L.; DE MOURA, K. S.; BACKES, B. E.; MENEZES, E. W.; BENVENUTTI, E. V.; NICOLODI, S.; RODRIGUES, R. C. Immobilization of pectinase on chitosan-magnetic particles: Influence of particle preparation protocol on enzyme properties for fruit juice clarification. Biotechnology Reports, v. 24, p. e00373. 2019. DOI: 10.1016/j.btre. 2019.e00373. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2019.e00373>

DAL MAGRO, L.; PESSOA, J. P. S.; KLEIN, M. P.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; RODRIGUES, R. C. Enzymatic clarification of orange juice in continuous bed reactors: Fluidized-bed versus packed-bed reactor. Catalysis Today. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.cattod.2020.02.003>

DANTAS, A.; VERRUCK, S.; LIZ, G. R.; HERNANDEZ, E.; PRUDENCIO, E. S. Lactose-free skim milk and prebiotics as carrier agents of Bifidobacterium BB-12 microencapsulation: physicochemical properties, survival during storage and in vitro gastrointestinal conditions behavior. International Journal of Food Science & Technology.

2020. <https://doi.org/10.1111/ijfs.14823>

DAOUD, F. B.-O.; KADDOUR, S.; SADOON, T. Adsorption of cellulase *Aspergillus niger* on a commercial activated carbon: Kinetics and equilibrium studies. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v.75, n. 1, p. 93-99. 2010.

<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2009.08.019>

DAS, A., JANA, A., PAUL, T., HALDER, S., GHOSH, K., MAITY, C., DAS MOHAPATRA, P., PATI, B., MONDAL, K. Thermodynamics and kinetic properties of halostable endoglucanase from *Aspergillus fumigatus* ABK9. *Journal of Basic Microbiology* v. 54, p. S142-S151. 2014.

<https://doi.org/10.1002/jobm.201300350>

DASH, A.; BANERJEE, R. Exploring indigenously produced celite-immobilized *Rhizopus oryzae* NRRL 3562-lipase for biodiesel production. *Energy*, v. 222, p. 119950. 2021.

<https://doi.org/10.1016/j.energy.2021.119950>

DEKKER, P.; KOENDERS, D.; BRUINS, M. Lactose-Free Dairy Products: Market Developments, Production, Nutrition and Health Benefits. *Nutrients*, v. 11, n. 3, p. 551. 2019.

<https://doi.org/10.3390/nu11030551>

DEL ARCO, J.; ALCÁNTARA, A. R.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; FERNÁNDEZ-LUCAS, J. Magnetic micro-macro biocatalysts applied to industrial bioprocesses. *Bioresource Technology*, v. 322, p. 124547. 2021.

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124547>

DENG, Z.; WANG, S.; ZHOU, B.; LI, J.; ZHOU, P.; LI, B.; LIANG, H. Carboxymethylpachyman-zein coated plant microcapsules-based β -galactosidase encapsulation system for long-term effective delivery. *Food Research International*, p. 108867. 2019.

<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108867>

DJALAL, M.; BASTIAN, F.; PUTRA, A. M.; LAGA, A. Buffer determination for immobilized enzymes in a batch system for glucose syrup production. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, v. 343, p. 012071. 2019.

<https://doi.org/10.1088/1755-1315/343/1/012071>

DONG, L.; ZHONG, Q. Dispersible biopolymer particles loaded with lactase as a potential delivery system to control lactose hydrolysis in milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2019.

<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b01546>

DORAISWAMY, N.; SARATHI, M.; PENNATHUR, G. Improvement in biochemical characteristics of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) with magnetic nanoparticles as support matrix. *Nanoarmoring of Enzymes with Carbon Nanotubes and Magnetic Nanoparticles*, p. 133-158. 2020.

<https://doi.org/10.1016/bs.mie.2019.10.019>

DORAISWAMY, N.; SARATHI, M.; PENNATHUR, G. Cross-linked esterase aggregates (CLEAs) using nanoparticles as immobilization matrix. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, n. 20198, p.1-9. 2019.

<https://doi.org/10.1080/10826068.2018.1536993>

DWEVEDI, A. Enzyme Immobilization Advances in Industry, Agriculture, Medicine, and the Environment. Springer International Publishing, Switzerland. 2016.

EL-NAGGAR, M. E.; ABDEL-ATY, A. M.; WASSEL, A. R., ELARABY, N. M.; MOHAMED, S. A. Immobilization of horseradish peroxidase on cationic microporous starch: Physico-bio-chemical characterization and removal of phenolic compounds. International Journal of Biological Macromolecules, v. 181, p. 734-742. 2021.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.03.171>

ELLIS, G. A.; DEAN, S. N.; WALPER, S. A. MEDINTZ, I. L. Quantum Dots and Gold Nanoparticles as Scaffolds for Enzymatic Enhancement: Recent Advances and the Influence of Nanoparticle Size. Catalysts, v.10, n. 1, p. 83. 2020.
<https://doi.org/10.3390/catal10010083>

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.; RAMOS, I.; ROCHA, F. Effect of the pH in the formation of β -galactosidase microparticles produced by a spray-drying process. International Journal of Biological Macromolecules, v. 78, p. 238-242. 2015.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.03.049>

ESTEVINHO, B. N.; SAMANIEGO, N.; TALENS-PERALES, D.; FABRA, M. J.; LÓPEZ-RUBIO, A.; POLAINA, J.; MARÍN-NAVARRO, J. Development of enzymatically-active bacterial cellulose membranes through stable immobilization of an engineered β -galactosidase. International Journal of Biological Macromolecules, v. 115, p. 476-482. 2018.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.04.081>

FABRA, M. J.; TALENS-PERALES, D.; ROMAN-SARMIENTO, A., LÓPEZ-RUBIO, A.; POLAINA, J. Effect of biopolymer matrices on lactose hydrolysis by enzymatically active hydrogel and aerogels loaded with β -galactosidase nanoflowers. Food Hydrocolloids, 106220. 2020.
<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106220>

FABBRO, A.; CELLOT, G.; PRATO, M.; BALLERINI, L. Interacting neurons with carbon nanotubes: Progress in Brain Research, p. 241-252. 2011. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53815-4.00003-0>

FACIN, B. R.; MORET, B.; BARETTA, D.; BELFIORE, L. A.; PAULINO, A. T. Immobilization and controlled release of β -galactosidase from chitosan-grafted hydrogels. Food Chemistry, v. 179, p. 44-51. 2015.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.01.088>

FALLEIROS, L. N. S. S.; CABRAL, B. V.; FISCHER, J.; GUIDINI, C. Z.; CARDOSO, C. L.; RESENDE, M. M.; RIBEIRO, E. J. Improvement of recovered activity and stability of the *Aspergillus oryzae* β -Galactosidase immobilized on Duolite® A 568 by combination of Immobilization Methods. Chem. Ind. Chem. Eng. Q., v. 23, n. 4, p. 495-506. 2017.

<https://doi.org/10.2298/CICEQ160912010F>

FAN, F.; ROOS, Y. H. Structural strength and crystallization of amorphous lactose in food model solids at various water activities. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, v. 40, p. 27-34. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2016.06.011>

FENG, K.; HUANG, Z.; PENG, B.; DAI, W.; LI, Y.; ZHU, X.; CAO, Y. Immobilization of *Aspergillus niger* lipase onto a novel macroporous acrylic resin: stable and recyclable biocatalysis for deacidification of high-acid soy sauce residue oil. *Bioresource Technology*, p. 122553. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122553>

FERNANDEZ-LOPEZ, L.; BARTOLOME-CABRERO, R.; RODRIGUEZ, M. D.; SANTOS, C. S.; RUEDA, N.; Fernandez-Lafuente, R. Stabilizing effects of cations on lipases depend on the immobilization protocol. *RSC Advances*, v. 5, n. 102, p. 83868-83875. 2015. <https://doi.org/10.1039/C5RA18344H>

FILHO, D. G.; SILVA, A. G.; GUIDINI, C. Z. Lipases: sources, immobilization methods, and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2019. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10027-6>

FISCHER, J. Hidrólise de Lactose por β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* Imobilizada em Reator de Leito Fixo. 2010. 137 f. Dissertação (Mestrado em Engenharias) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2010.

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

FOUROU, H.; ZAZOUA, A.; BRAIEK, M.; JAFFREZIC-RENAULT, N. An enzyme biosensor based on beta-galactosidase inhibition for electrochemical detection of cadmium (II) and chromium (VI). *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, p. 1 - 14. 2016. <https://doi.org/10.1080/03067319.2016.1209659>

FRANCESCONI, C. F. M.; MACHADO, M. B.; STEINWURZ, F.; NONES, R. B.; QUILICI, F. A.; CATAPANI, W. R.; BAFUTTO, M. Oral administration of exogenous lactase in tablets for patients diagnosed with lactose intolerance due to primary hypolactasia. *Arquivos de Gastroenterologia*, 53(4), 228-234. 2016. <https://doi.org/10.1590/S0004-28032016000400004>

FU, J.; YANG, Y. R.; DHAKAL, S.; ZHAO, Z.; LIU, M.; ZHANG, T.; YAN, H. Assembly of multi enzyme complexes on DNA nanostructures. *Nature Protocols*, v.11, n. 11, p. 2243-2273. 2016. <https://doi.org/10.1038/nprot.2016.139>

GAN, J. S.; BAGHERI, A. R.; ARAMESH, N.; GUL, I.; FRANCO, M.; LMULAIKY, Y. Q.; BILAL, M. Covalent organic structures as emerging host platforms for Benzyme immobilization and robust biocatalysis - a review. *International Journal of Biological*

Macromolecules, v. 167, p. 502-515, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.12.002>

GARCIA, H. S.; LÓPEZ-HERNANDEZ, A.; HILL, C. G. Enzyme Technology - Dairy Industry Applications. Reference Module in Life Sciences. 2017. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.09232-3>

GENNARI, A.; MOBAYED, F. H.; RAFAEL, S. R.; RODRIGUES, R. C.; SPEROTTO, R. A.; VOLPATO, G., SOUZA, V. C. F. Modification of *Immobilized* 150 support for protein immobilization: Effects on the properties of immobilized *Aspergillus oryzae* β -galactosidase. Biotechnology Progress. 2018. <https://doi.org/10.1002/btpr.2652>

GILANI, S. L.; NAJAFPOUR, G. D.; MOGHADAMNIAB, A.; KAMARUDDIN, A. H. Kinetics and Isotherm Studies of the Immobilized Lipase on Chitosan Support. International Journal of Engineering (IJE), Transactions a: Basics, v.29, n. 10, p. 1319-1331. 2016. <https://doi.org/10.5829/idosi.ije.2016.29.10a.01>

GLOBAL SPECIALITY ENZYMES INDUSTRY (2019 TO 2025) - technological innovations and wide industry scope presents opportunities. (2020). Focus on Catalysts, v. 2020, n. 6, p. 2. 2020. DOI: 10.1016/j.focat.2020.05.007. <https://doi.org/10.1016/j.focat.2020.05.007>

GONAWAN, F. N. Immobilized β -Galactosidase-Mediated Conversion of Lactose: Process, Kinetics and Modeling Studies. Springer Theses. 2019. DOI:10.1007/978-981-13-3468-9. <https://doi.org/10.1007/978-981-13-3468-9>

GONÇALVES, P. M. C.; KIECKBUSCH, T. G.; FIRMANI PERNA, R.; TOMIÊ FUJIMOTO, J.; ANDRES VILLALBA MORALES, S.; ROMANELLI, J. P. Research on the enzyme immobilization based on bibliometric analysis. Process Biochemistry. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.09.016>

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 kinetic study. Biotechnology Progress, v. 33, n. 6, p. 1568-1578. 2017. <https://doi.org/10.1002/btpr.2509>

GU, K.; XU, Y.; LI, H.; GUO, Z.; ZHU, S.; ZHU, S.; ZHU, W.-H. Real-Time Tracking and in Vivo Visualization of β -Galactosidase Activity in Colorectal Tumor with a Ratiometric Near-Infrared Fluorescent Probe. Journal of the American Chemical Society, v. 138, n. 16, p. 5334-5340. 2016. <https://doi.org/10.1021/jacs.6b01705>

GUERRERO, C.; ABURTO, C.; SÚAREZ, S.; VERA, C.; ILLANES, A. Improvements in the production of *Aspergillus oryzae* β -galactosidase crosslinked aggregates and their use in repeated-batch synthesis of lactulose. International Journal of Biological Macromolecules. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.09.117>

GUERRERO, C.; VERA, C.; CONEJEROS, R.; ILLANES, A. Transgalactosylation and hydrolytic activities of commercial preparations of β -galactosidase for the synthesis of prebiotic carbohydrates. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 70, p. 9-17. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2014.12.006>

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>

GÜRDAS, S; GULEC, h. a.; MUTLU, m. Adsorption isotherm and kinetic modeling of β -galactosidase immobilization onto a basic resin (Duolite A 568). *Asian Journal of Chemistry*, v. 23, n. 3, p. 1049-1054. 2011.

HACKENHAAR, C. R.; SPOLIDORO, L. S.; FLORES, E. E. E.; KLEIN, M. P.; HERTZ, P. F. Batch synthesis of galactooligosaccharides from co-products of milk processing using immobilized β -galactosidase from *Bacillus circulans*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 36, p. 102136. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2021.102136>

HANAUER, D. C.; SOUZA, A. G.; CARGNIN, M. A.; GASPARIN, B. C.; ROSA, D. S.; PAULINO, A. T. Pectin-based biohydrogels reinforced with eucalyptus sawdust: Synthesis, characterization, β -D-Galactosidase immobilization and activity. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, v. 97, p. 368-382. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2021.02.022>

HERNÁNDEZ-CORROTO, E.; SÁNCHEZ-MILLA, M.; SÁNCHEZ-NIEVES, J.; LA MATA, F. J.; MARINA, M. L.; GARCÍA, M. C. Immobilization of thermolysin enzyme on dendronized silica supports. Evaluation of its feasibility on multiple protein hydrolysis cycles. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 165, p. 2338-2348. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.10.138>

HERTZLER, S.; SAVAIANO, D. A.; DILK, A.; JACKSON, K. A.; BHRIAN, S. N.; SUAREZ, F. L. Nutrient Considerations in Lactose Intolerance. *Nutrition in the Prevention and Treatment of Disease*, p. 875-892. 2017. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802928-2.00040-0>

HOMAEI, A. A.; SARIRI, R.; VIANELLO, F.; STEVANATO, R. Enzyme immobilization: an update. *Journal of Chemical Biology*, v. 6, n. 4, p. 185-205. 2013. <https://doi.org/10.1007/s12154-013-0102-9>

HOMAEI, A. In: Rai, R. (Ed.), *Advances in Food Biotechnology*, first ed. John Wiley and Sons, Ltd., Sussex, United Kingdom, p. 287-301. 2016.

HU, Y., DAI, L.; LIU, D.; DU, W.; WANG, Y. Progress & prospect of metal-organic frameworks (MOFs) for enzyme immobilization (enzyme/MOFs). *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 91, p. 793-801. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.04.103>

HWANG, E. T.; LEE, S. Multi-Enzymatic Cascade Reactions via Enzyme Complex by Immobilization. *ACS Catalysis*. 2019. <https://doi.org/10.1021/acscatal.8b04921>

IMAM, H. T.; MARR, P. C.; MARR, A. C. Enzyme entrapment, biocatalyst immobilization without covalent attachment. *Green Chemistry*, v. 23, n. 14, p. 4980-5005. 2021. <https://doi.org/10.1039/D1GC01852C>

JAFARY, F.; PANJEHPOUR, M.; VARSHOSAZ, J.; YAGHMAEI, P. Stability Improvement of Immobilized Alkaline Phosphatase Using Chitosan Nanoparticles. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v. 33, n. 2, p. 243-250. 2016. <https://doi.org/10.1590/0104-6632.20160332s20140074>

JAYAMUTHUNAGAI, J.; GAUTAM, P.; SRISOWMEYA, G.; CHAKRAVARTHY, M. Biocatalytic production of D-tagatose: a potential rare sugar with versatile applications. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, v. 57, p. 3430 - 3437. 2017. <https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1126550>

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

JIN, L.; LI, Y.; REN, X. H.; LEE, J. H. Immobilization of Lactase onto Various Polymer Nanofibers for Enzyme Stabilization and Recycling. *J. Microb Biotechnol.* n. 25, p. 1291-8. 2015. <https://doi.org/10.4014/jmb.1501.01012>

JUTURU, V., WU, J. C. Microbial cellulases: Engineering, production and applications. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 33, p. 188-203. 2014. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.01.077>

KANEDA, T., GREENBAUM, C., KLINE, K. World Population Data Sheet Shows Older Populations Growing. Total Fertility Rates Declining. <https://www.prb.org/2020-world-population-data-sheet/>. (Accessed 9 Outubro 2021).

KAO, K.-C.; LIN, T.-S.; MOU, C.-Y. Enhanced Activity and Stability of Lysozyme by Immobilization in the Matching Nanochannels of Mesoporous Silica Nanoparticles. *The Journal of Physical Chemistry C*, v. 118, n. 13, p. 6734-6743. 2014. <https://doi.org/10.1021/jp4112684>

KARAMI, F.; GHORBANI, M.; MAHOONAK, A. S.; KHODARAHMI, R. Fast, inexpensive purification of β -glucosidase from *Aspergillus niger* and improved catalytic/physicochemical properties upon the enzyme immobilization: Possible broad prospects for industrial applications. *LWT*, 108770. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108770>

KARIM, A.; BIBI, Z.; REHMAN, H. U.; AMAN, A.; QADER, S. A. U.; RASHID, M. H. Single step immobilization of C M Case within agarose gel matrix: Kinetics and thermodynamic studies. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 200, p. 111583. 2021.

<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2021.111583>

KHAN, M.; HUSAIN, Q.; NAQVI, A. H. Graphene based magnetic nanocomposites as versatile carriers for high yield immobilization and stabilization of β -galactosidase. RSC Advances, v. 6, n. 58, p. 53493-53503. 2016. <https://doi.org/10.1039/C6RA06960F>

KHAN, M.; HUSAIN, Q.; BUSHRA, R. Immobilization of β -galactosidase on surface modified cobalt/multiwalled carbon nanotube nanocomposite improves enzyme stability and resistance to inhibitor. International Journal of Biological Macromolecules, v. S0141813017310498-. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.07.088>

KHARE, S.; PRAKASH, O. Current developments in biotechnology and bioengineering: production, isolation and purification of industrial products. J. Clean. Prod, v. 158, p. 380-381. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.05.040>

KHOABI, M.; MOTEVALIZADEH, S. F.; ASADGOL, Z.; FOROOTANFAR, H.; SHAFIEE, A.; FARAMARZI, M. A. Polyethyleneimine-modified superparamagnetic Fe₃O₄ nanoparticles for lipase immobilization: Characterization and application. Materials Chemistry and Physics, v. 149-150, p. 77-86. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2014.09.039>

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

KOLEV SLAVOV, A. Dairy Wastewaters - General Characteristics and Treatment Possibilities - A Review. Food Technology and Biotechnology, v. 55, n .1. 2017. <https://doi.org/10.17113/ftb.55.01.17.4520>

KONG, L.; ADIDHARMA, H. A new adsorption model based on the Van Der Waals generalized partition function for the description of all types of adsorption isotherms. Chem. Eng. J. v. 375, p. 112 - 122. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2019.122112>

KUJAWA, J.; GŁODEK, M.; LI, G.; AL-GHARABLI, S.; KNOZOWSKA, K.; KUJAWSKI, W. Highly effective enzymes immobilization on ceramics: Requirements for supports and enzymes. Science of The Total Environment, v. 801, p. 149647. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.149647>

KUMAR, R.; LAL, S. Synthesis of organic nanoparticles and their applications in drug delivery and food nanotechnology: A Review, Journal of Nanomaterials & Molecular Nanotechnology, v. 3. 2014. <https://doi.org/10.4172/2324-8777.1000150>

KURIBAYASHI, L. M.; RIBEIRO, V. P. R.; SANTANA, R. C.; RIBEIRO, E. J.; SANTOS, M. G.; FALLEIROS, L. N. S. S.; GUIDINI, C. Z. Immobilization of β -galactosidase from *Bacillus licheniformis* for application in the dairy industry. Applied Microbiology and

Biotechnology, v.105, n. 9, p. 3601-3610. 2021.

<https://doi.org/10.1007/s00253-021-11325-8>

LEE, C. H.; LEE, H. S.; LEE, J.W.; KIM, J.; LEE, J. H.; JIN, E. S.; HWANG, E.T. Evaluating enzyme stabilizations in calcium carbonate: Comparing in situ and crosslinking mediated immobilization. *International Journal of Biological Macromolecules*, v.175, p. 341 - 350, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.02.028>

LEE, S. W.; CHEON, S. A.; KIM, M. I.; PARK, T. J. Organic-inorganic hybrid nanoflowers: types, characteristics, and future prospects. *Journal of Nanobiotechnology*, v. 13, n. 1. 2015. <https://doi.org/10.1186/s12951-015-0118-0>

LEIBLY, D. J.; NGUYEN, T. N.; KAO, L. T.; HEWITT, S. N.; BARRETT, L. K.; VOORHIS, W. V. C. Stabilizer additives added during cell lysis aid in the solubilization of recombinant proteins. *PLoS One*, v. 7, p. e52482. 2012. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052482>

LEITE, A. C. S.; CORTES, N. M. S; CORTEZ, N.M. S.; ALBUQUERQUE, S. S. M. C.; SHINOHARA, N. K. S.; MACEDO, I. M. E.; ANDRADE, S. A. C. Production of beta-galactosidase fused to a cellulose-binding domain for application in sustainable industrial processes. *Bioresource Technology*, v. 326, p. 124747, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.124747>

LI, H.; CAO, Y.; LI, S.; JIANG, Y.; CHEN, J.; WU, Z. Optimization of a dual-functional biocatalytic system for continuous hydrolysis of lactose in milk. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2018.07.009>

LI, Q.; WANG, X.; LOU, X.; YUAN, H.; TU, H.; LI, B.; ZHANG, Y. Genipin-crosslinked electrospun chitosan nanofibers: Determination of crosslinking conditions and evaluation of cytocompatibility. *Carbohydrate Polymers*, v. 130, p. 166-174. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.05.039>

LI, S.; ZHONG, L.; WANG, H.; LI, J.; CHENG, H.; MA, Q. Process optimization of polyphenol oxidase immobilization: Isotherm, kinetic, thermodynamic and removal of phenolic compounds. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 185, p. 792 - 803. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.06.188>

LIN, L., LI, Y., REN, X.H.; LEE, J. H. Immobilization of lactase onto various polymer nanofibers for enzyme stabilization and recycling. *J. Microb Biotechnol*, v. 25, n. 1291, p. 8. 2015. <https://doi.org/10.4014/jmb.1501.01012>

LINDEQUE, R. M.; WOODLEY, J. M. Reactor Selection for Effective Continuous Biocatalytic Production of Pharmaceuticals. *Catalysts*, v. 9, n. 3, p. 262. 2019. <https://doi.org/10.3390/catal9030262>

LING, X. M.; WANG, X. Y.; MA, P.; YANG, Y.; QIN, J. M.; ZHANG, X. J.; YE-WANG ZHANG, Y. W. Covalent Immobilization of Penicillin G Acylase onto Fe₃O₄@Chitosan

Magnetic. *J. Microbiol. Biotechnol.*, v. 26, n. 5, p. 829 - 836. 2016.
<https://doi.org/10.4014/jmb.1511.11052>

LIU, D.-M.; CHEN, J.; SHI, Y.-P. Advances on methods and easy separated support materials for enzymes immobilization. *TrACTrends in Analytical Chemistry*, v.102, p. 332-342. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.03.011>

LUKITO, W.; MALIK S.; G., SURONO I. S.; WAHLQVIST M. L. From 'lactose intolerance' to 'lactose nutrition' *Asian Pac J ClinNutr*, v.24, p. S1-S8. 2015.

MAHMOUDPOUR, M.; DING, S.; LYU, Z.; EBRAHIMI, G.; DU, D.; EZZATI NAZHAD DOLATABADI, J.; LIN, Y. Aptamer functionalized nanomaterials for biomedical applications: Recent advances and new horizons. *Nano Today*, v. 39, p. 101 177. 2021.
<https://doi.org/10.1016/j.nantod.2021.101177>

MAITY, M.; BHATTACHARYYA, A. BHOWAL, J. Production and immobilization of β -galactosidase isolated from *Enterobacter aerogenes* KCTC2190 by entrapment method using agar-agar organic matrix. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2021.
<https://doi.org/10.1007/s12010-021-03534-8>

MANERA, A. P.; ZABOT, G. L.; VLADIMIR OLIVEIRA, J.; OLIVEIRA, D.; MAZUTTI, M. A.; KALIL, S. J.; FILHO, F. M. Enzymatic synthesis of galactooligosaccharides using pressurised fluids as reaction medium. *Food Chemistry*, v. 133, n. 4, p. 1408-1413. 2012.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.02.027>

MANGIAGALLI, M.; LOTTI, M. Cold-Active β -Galactosidases: Insight into Cold Adaptation Mechanisms and Biotechnological Exploitation. *Marine Drugs*, v. 19, n. 1, p. 43. 2021. <https://doi.org/10.3390/md19010043>

MÁRQUEZ, A.; KRISZTINA KOCSIS, K.; ZICKLER, G.; BOURRET, G. R.; FEINLE, A.; HÜSING, N.; HIMLY, M.; DUSCHL, A.; THOMAS BERGER, T; DIWALD, O. Enzyme adsorption-induced activity changes: a quantitative study on TiO₂ model agglomerates. *JournL of Nanobiotechnology*, v. 15, p. 55. 2017. DOI: DOI 10.1186/s12951-017-0283. <https://doi.org/10.1186/s12951-017-0283-4>

MERAAT, R.; ISSAZADEH, K.; ZIABARI, A. A.; GHASEMI, M. F. Rapid Detection of *Escherichia coli* by β -Galactosidase Biosensor Based on ZnO NPs and MWNTCs: A Comparative Study. *Current Microbiology*. 2020.
<https://doi.org/10.1007/s00284-020-02040-0>

MISSON, M.; JIN, B.; CHEN, B.; ZHANG, H. Enhancing enzyme stability and metabolic functional ability of β -galactosidase through functionalized polymer nanofiber immobilization. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, v. 38, n.10, p. 1915-1923. 2015.
<https://doi.org/10.1007/s00449-015-1432-5>

MOHAMED, S. A.; AL-HARBI, M. H.; ALMULAIKY, Y. Q.; IBRAHIM, I. H.; EL-SHISHTAWY, R. M. Immobilization of horseradish peroxidase on Fe₃O₄ magnetic nanoparticles. *Electronic Journal of Biotechnology*, v. 27, p. 84-90. 2017.

<https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2017.03.010>

MONIER, M.; YOUSSEF, I.; ABDEL-LATIF, D. A. Synthesis of photo-responsive chitosan-cinnamate for efficient entrapment of β -galactosidase enzyme. *Reactive and Functional Polymers*, v. 124, p. 129-138. 2018.

<https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2018.01.012>

MORIOKA, L. R. I.; VIANA, C. S.; ALVES, É. P. PAIÃO, F. G.; TAKIHARA, A. M.; KAKUNO, A. S. S.; SUGUIMOTO, H. H. Concentrated beta-galactosidase and cell permeabilization from *Saccharomyces fragilis* IZ 275 for beta-galactosidase activity in the hydrolysis of lactose. *Food Science and Technology*. 2019.

<https://doi.org/10.1590/fst.06017>

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

MORTAZAVI, S.; AGHAEI, H. Make proper surfaces for immobilization of enzymes: Immobilization of lipase and α -amylase on modified na-sepiolite. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.07.103>

MUKUNDAN, S.; MELO, J. S.; SEN, D.; BAHADUR, J. Enhancement in β -galactosidase activity of *Streptococcus lactis* cells by entrapping in microcapsules comprising of correlated silica nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 195, p. 111245. 2020.

<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2020.111245>

NADAR, S. S.; RATHOD, V. K. A co-immobilization of pectinase and cellulase onto magnetic nanoparticles for antioxidant extraction from waste fruit peels. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.12.015>

NADAR, S. S.; RATHOD, V. K. Immobilization of proline activated lipase within metalorganic framework (MOF). *Int. J. Biol. Macromol*, v. 152, p. 1108-1112. 2020. DOI: 1108-1112. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.10.199>

NAFEES, T.; BHATTI, A. A.; JADOON, U. K.; AHMAD, F.; AHMAD, I.; KANO, M.; MENEZES, B. C.; AHSAN, M.; SYED. NU. H. Model-Based Quality, Exergy, and Economic Analysis of Fluidized Bed Membrane Reactors. *Membranes*. V. 11, n. 10, p.765.2021. <https://doi.org/10.3390/membranes11100765>

NARAYANAN, C. M.; MONANGI, T.; PRASAD, H.; CHAKRABORTY, N. Studies on Performance Analysis and Computer Aided Design of Inverse Fluidized Bed Bioreactors with Nanosupport Particles. *International Journal of Chemical Reactor Engineering*, v. 12, n. 1. 2014. <https://doi.org/10.1515/ijcre-2014-0027>

NAWAZ, M. A.; REHMAN, H.U.; BIBI, Z.; AMAN, A.; QADER, S. A. Continuous degradation of maltose by enzyme entrapment technology using calcium alginate beads as a matrix. *Biochemistry and Biophysics Reports*, v. 4, p. 250-256. 2015.

<https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2015.09.025>

NAWAZ, M. A.; REHMAN, H.U.; BIBI, Z.; AMAN, A.; QADER, S. A. Continuous degradation of maltose by enzyme entrapment technology using calcium alginate beads as a matrix. *Biochemistry and Biophysics Reports*, v. 4, p. 250-256. 2015.

<https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2015.09.025>

NAZIR, A.; MAAN, A. A.; , SHAUKAT, M. N. Potential applications of industrial by-products of food in the dairy industry. *Recovery of food waste (second edition)*, p. 445-460, 2021. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-820563-1.00009-3>

NGUYEN, V. D.; STYEVKÓ, G.; MADARAS, E.; HAKTANIRLAR, G.; TRAN, A. T. M., BUJNA, E.; NGUYEN, Q. D. Immobilization of β -galactosidase on chitosan-coated magnetic nanoparticles and its application for synthesis of lactulose-based galactooligosaccharides. *Process Biochemistry*. 2019.

<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.05.021>

OSMAN, A.; SYMEOU, S.; TRISSE, V.; WATSON, K. A.; TZORTZIS, G.; CHARALAMPOPOULOS, D. Synthesis of prebiotic galactooligosaccharides from lactose using bifidobacterial β -galactosidase (Bbg IV) immobilised on DEAE-Cellulose, Q-Sepharose and amino-ethyl agarose. *Biochemical Engineering Journal*, v. 82, p. 188-199. 2014.

<https://doi.org/10.1016/j.bej.2013.11.020>

PAIVA, V. N.; GOMES, E. R.; SANTOS, V. M.; STEPHANI, R.; CARVALHO, A. F.; PERRONE, I. T. Desafios tecnológicos na produção de produtos com baixo teor de lactose. *Rev. Inst. Laticínios Cândido Tostes*, v. 73, n. 2, p. 91-101, 2018.

<https://doi.org/10.14295/2238-6416.v73i2.665>

PANIGA, J. M., REISER J. Aptamer guided delivery of nucleic acid-based nanoparticles, DNA and RNA *Nanotechnology*, v. 2, p. 42-52. 2016.

<https://doi.org/10.1515/rnan-2015-0005>

PATILA, M.; CHALMPES, N.; DOUNOUSI, E.; STAMATIS, H.; GOURNIS, D. Use of functionalized carbon nanotubes for the development of robust nanobiocatalysts. *Methods in Enzymology*. 2019. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2019.10.015>

PHUKAN, K.; KARDONG, D. Isolation of naringinase producing soil bacteria from *Psidium guajava* L. and *Terminalia chebula* Retz and its enzymatic activity. *AIMS Molecular Science*, v. 7, n. 3, p. 292-304. 2020.

<https://doi.org/10.3934/molsci.2020014>

PINHEIRO, B. B.; RIOS, N. S.; RODRÍGUEZ AGUADO, E.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; FREIRE, T. M.; FECHINE, P. B. A.; GONÇALVES, L. R. B. Chitosan activated with divinyl sulfone: a new heterofunctional support for enzyme immobilization. Application in the immobilization of lipase B from *Candida antarctica*. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2019.

<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.02.145>

PORTNOY, M.; BARBANO, D. M. Lactose: use, measurement and expression of results. *Journal of Dairy Science*, v.104, p. 8314-8325, 2021.
<https://doi.org/10.3168/jds.2020-18706>

RAGHAV, S.; KUMAR, D. Adsorption Equilibrium, Kinetics, and Thermodynamic Studies of Fluoride Adsorbed by Tetrametallic Oxide Adsorbent. *Journal of Chemical & Engineering Data*, v. 63, n. 5, p. 1682-1697. 2018. <https://doi.org/10.1021/acs.jced.8b00024>

RAY, S.; DAS, G. Adsorption. *Process Equipment and Plant Design*, 351-384. 2020.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814885-3.00012-9>

RAVEENDRAN, S.; PARAMESWARAN, B.; UMMALYMA, S. B.; ABRAHAM, A.; MATHEW, A. K.; MADHAVAN, A.; REBELLO, S.; PANDEY, A. Applications of Microbial in Food Industry. *Food Technol. Biotechnol.* v.56, n. 1, p. 16-30, 2018.
<https://doi.org/10.17113/ftb.56.01.18.5491>

REIS, C. L. B.; SOUSA, E. Y. A.; SERPA, J. F.; OLIVEIRA, R. C.; SANTOS, J. C. S. Design of Immobilized Enzyme Biocatalysts: Drawbacks and Opportunities. *Revisão Quím. Nova*, v. 42, n. 7. 2019. DOI: <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170381>.
<https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170381>

REN, S.; JIANG, S.; YAN, X.; CHEN, R.; CUI, H. Challenges and Opportunities: Porous Supports in Carbonic Anhydrase Immobilization. *Journal of CO₂ Utilization*, v. 42, p. 101305. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.jcou.2020.101305>

RIBEIRO, B.; BOTELHO, E. C.; COSTA, M. L.; BANDEIRA, C. F. Carbon nanotube buckypaper reinforced polymer composites: a review. *Polímeros*, v. 27, n. 3, p. 247-255. 2017. <https://doi.org/10.1590/0104-1428.03916>

RICARDI, N. C.; ARENAS, L. T.; BENVENUTTI, E. V.; HINRICHS, R., FLORES, E. E. E.; HERTZ, P. F.; COSTA, T. M. H. High performance biocatalyst based on β -D-galactosidase immobilized on mesoporous silica/titania/chitosan material. *Food Chemistry*, v. 359, p. 129890. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129890>

RODRIGUEZ-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, n.12, p. 189. 2016. <https://doi.org/10.3390/catal6120189>

RUEDA, N.; SANTOS, J. C. S.; TORRES, R.; ORTIZ, C.; BARBOSA, O.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Improved performance of lipases immobilized on heterofunctional octyl-glyoxyl agarose beads. *RSC Adv.*, v. 5, p. 11212 - 11222. 2015.
<https://doi.org/10.1039/C4RA13338B>

SAALLAH, S.; LENGGORO, I. W. Nanoparticles Carrying Biological Molecules: Recent Advances and Applications. *KONA Powder and Particle Journal*, v. 35, n.0, p. 89-111. 2018.
<https://doi.org/10.14356/kona.2018015>

SAMPAIO, L. M. P.; PADRÃO, J.; FARIA, J.; SILVA, J. P., SILVA, C. J.; DOURADO, F.; ZILLE, A. Laccase immobilization on bacterial nanocellulose membranes: Antimicrobial, kinetic and stability properties. *Carbohydrate Polymers*, v. 145, p. 1-12. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.03.009>

SAQIB, S.; AKRAM, A.; HALIM, S. A.; TASSADUQ, R. Sources of β -galactosidase and its applications in food industry. *Biotech*, v. 7, n. 1. 2017. <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0645-5>

SASS, A. C.; JÖRDENING, H. J. Immobilization of β -galactosidase From *Aspergillus oryzae* on electrospun Gelatin nanofiber Mats for the production of galactooligosaccharides. *Appl Biochem Biotechnol.*, v.191, p. 1155-1170. 2020. <https://doi.org/10.1007/s12010-020-03252-7>

SATAR, R.; ANSARI, S. A. Functionalized agarose as an effective and novel matrix for immobilizing *Cicer arietinum* β -galactosidase and its application in lactose hydrolysis. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v. 34, n. 2, p. 451-457. 2015. <https://doi.org/10.1590/0104-6632.20170342s20160107>

SATAR, R.; JAFRI, M. A.; RASOOL, M.; ANSARI, S. A. Role of Glutaraldehyde in Imparting Stability to Immobilized β -Galactosidase Systems. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 60, n. 0. 2018. <https://doi.org/10.1590/1678-4324-2017160311>

SATYAWALI, Y.; ROY, S. V.; ROEVENS, A.; MEYNEN, V.; MULLENS, S.; JOCHEMS, P.; DEJONGHE, W. Characterization and analysis of the adsorption immobilization mechanism of β -galactosidase on metal oxide powders. *RSC Advances*, v. 3, n. 46, p. 24054. 2013. <https://doi.org/10.1039/c3ra45107k>

SCHULZ, P.; RIZVI, S. S. H. Hydrolysis of Lactose in Milk: Current Status and Future Products, *Food Reviews International*. 2021.

SEDDIGH S.; DARABI M. Comprehensive analysis of beta-galactosidase protein in plants based on *Arabidopsis thaliana*. *Turk J Biol.* v.38, p. 140-150. 2014. <https://doi.org/10.3906/biy-1307-14>

SELVARAJAN, E.; MOHANASRINIVASAN, V.; SUBATHRA DEVI, C.; GEORGE PRIYA DOSS, C. Immobilization of β -galactosidase from *Lactobacillus plantarum* HF571129 on ZnO nanoparticles: characterization and lactose hydrolysis. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, v. 38, n. 9, p. 1655-1669. 2015. <https://doi.org/10.1007/s00449-015-1407-6>

SIGURDARDÓTTIR, S. B.; LEHMANN, J.; OVTAR, S.; GRIVEL, J.-C., NEGRA, M. D., KAISER, A., PINELO, M. Enzyme Immobilization on Inorganic Surfaces for Membrane Reactor Applications: Mass Transfer Challenges, Enzyme Leakage and Reuse of Materials. *Advanced Synthesis & Catalysis*, v. 360, n.14, p. 2578-2607. 2018. <https://doi.org/10.1002/adsc.201800307>

SEN, P.; NATH, A.; BHATTACHARJEE, C.; CHOWDHURY, R.; BHATTACHARYA, P. Process engineering studies of free and micro-encapsulated β -galactosidase in batch and packed bed bioreactors for production of galactooligosaccharides. *Biochemical Engineering Journal*, v. 90, p. 59-72. 2014. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2014.05.006>

SEREY, M.; VERA, C.; GUERRERO, C.; ILLANES, A. Immobilization of *Aspergillus oryzae* β -galactosidase in cation functionalized agarose matrix and its application in the synthesis of lactulose. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.11.110>

SHAFI, A.; AHMED, F.; HUSAIN, Q. β -Galactosidase mediated synthesized nanosupport for the immobilization of same enzyme: Its stability and application in the hydrolysis of lactose. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 184, p. 57-67. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.06.034>

SHAHID, F.; AMAN, A.; NAWAZ, M. A.; KARIM, A.; UL QADER, S. A. Chitosan hydrogel microspheres: an effective covalent matrix for crosslinking of soluble dextranase to increase stability and recycling efficiency. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, v. 40, n. 3, p. 451-461. 2017. <https://doi.org/10.1007/s00449-016-1713-7>

SHAHRESTANI, H.; TAHERI-KAFRANI, A.; SOOZANIPOUR, A.; TAVAKOLI, O. (2016). Enzymatic clarification of fruit juices using xylanase immobilized on 1,3,5-triazine-functionalized silica-encapsulated magnetic nanoparticles. *Biochemical Engineering Journal*, v. 109, p. 51-58. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2015.12.013>

SHARMA, A.; THATAI, K. S.; KUTHIALA, T.; SINGH, G.; ARYA, S. K. Employment of polysaccharides in enzyme immobilization. *Reactive and Functional Polymers*, v. 167, p. 105005. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2021.105005>

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>

SHEN, J.; CHEN, J.; JENSEN, P. R.; SOLEM, C. Sweet As Sugar - Efficient Conversion of Lactose into Sweet Sugars Using a Novel Whole-Cell Catalyst. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2019. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b01529>

SIANCAS, C. A.G.; SÚAREZ, S., GAJARDO, C. A.; UBILLA, V. C.; RAMÍREZ, N., VERA, C.; ILLANES, A. Comparison of batch and repeated batch operation of lactulose synthesis with cross-linked aggregates of *Bacillus circulans* β -galactosidase. *Process Biochemistry*, 94, 224-234. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.04.025>

SIGURDARDÓTTIR, S. B.; LEHMANN, J.; OVTAR, S.; GRIVEL, J.-C., NEGRA, M. D., KAISER, A., PINELO, M. Enzyme Immobilization on Inorganic Surfaces for Membrane Reactor Applications: Mass Transfer Challenges, Enzyme Leakage and Reuse of Materials. *Advanced Synthesis & Catalysis*, v. 360, n. 14, p. 2578-2607. 2018. <https://doi.org/10.1002/adsc.201800307>

SILVA, L. C. C.; SOUSA, C. C.; FALLEIROS, L. N. S. S. Imobilização de β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* em resina de troca iônica e reticulação com glutaraldeído. Congresso Brasileiro de engenharia química em Iniciação Científica. 2019. <https://doi.org/10.5151/cobecic2019-PBIO23>

SIMOVIĆ, M.; MILIVOJEVIĆ, A.; ĆOROVIĆ, M.; BANJANAC, K.; BEZBRADICA, D. Whey valorization using transgalactosylation activity of immobilized β -galactosidase. International Journal of Food Science & Technology. 2019. <https://doi.org/10.1111/ijfs.14222>

SINGH, R.; KUMAR, M.; MITTAL, A.; MEHTA, P. K. Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. 3 Biotech, v. 6, n. 2. 2016. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0485-8>

SINGH, R.; SINGH, A.; SACHAN, S. Enzymes used in the Food Industry: Friends or Foes? Enzymes in Food Biotechnology, p. 827-843. 2019. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813280-7.00048-7>

SINGH, R.; SINGH, A.; SACHAN, S. Enzymes used in the Food Industry: Friends or Foes? Enzymes in Food Biotechnology, p. 827-843. 2019. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813280-7.00048-7>

SINGH, T. A.; JAJOO, A.; BHASIN, S. Production and application of glucose isomerase from *Streptomyces enissocaesilis* and amylase from *Streptomyces sp.* for the synthesis of high fructose corn syrup. SN Applied Sciences, v. 2, n.12. 2020. <https://doi.org/10.1007/s42452-020-03757-0>

SNOCH, W.; TATARUCH, M.; ZASTAWNY, O.; CICHÓN, E. M.; GOSELIN, M.; CABANA, H.; GUZIK, M. Hollow silica microspheres as robust immobilization carriers Bioorg. Chem. 2019.

SRIVASTAVA, A.; MISHRA, S.; CHAND, S. Transgalactosylation of lactose for synthesis of galacto-oligosaccharides using *Kluyveromyces marxianus* NCIM 3551. New Biotechnology, v. 32, n. 4, p. 412-418. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2015.04.004>

SUÁREZ, S.; GUERRERO, C.; VERA, C., ILLANES, A. Effect of particle size and enzyme load on the simultaneous reactions of lactose hydrolysis and transgalactosylation with glyoxyl-agarose immobilized β -galactosidase from *Aspergillus oryzae*. Process Biochemistry. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.08.016>

SUN, J.; XU, B.; SHI, Y.; YANG, L.; MA, H. Activity and Stability of Trypsin Immobilized onto Chitosan Magnetic Nanoparticles. Advances in Materials Science and Engineering, p. 1-10. 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/1457072>

TALENS-PERALES, D.; FABRA, M. J.; MARTÍNEZ-ARGENTE, L.; MARÍN-NAVARRO, J.; POLAINA, J. Recyclable thermophilic hybrid protein-inorganic nanoflowers for the hydrolysis of milk lactose. International Journal of Biological

Macromolecules. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.02.115>

TAMBORINI, L.; FERNANDES, P; PARADISI, MOLINARI, F. Flow Bioreactors as Complementary Tools for Intensifying Biocatalytic Processes. *Trends Biotechnol*, v. 36, p. 73 - 88. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2017.09.005>

Tate & Lyle Introduces DOLCIA PRIMA® Crystalline Alluloserias. Acessado em 2 de Novembro de 2021:<<https://www.tateandlyle.com/news/tate-lyle-introduces-dolcia-prima-crystalline-allulose-low-calorie-solution-provides-full>>

TAVARES, A. P. M.; SILVA, C. G.; DRAŽIĆ, G.; SILVA, A. M. T.; LOUREIRO, J. M.; FARIA, J. L. Laccase immobilization over multi-walled carbon nanotubes: Kinetic, thermodynamic and stability studies. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 454, p. 52-60. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2015.04.054>

TECHNICAL ENZYMES MARKET DE \$1.5 BN TECHNICAL ENZYMES MARKET BY TYPE, INDUSTRY, SOURCE, FORM AND REGION - GLOBAL FORECAST TO 2026.Focus on Catalysts, n. 5, p. 2. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.focat.2020.04.006>

TEMOÇIN, Z.; İNAL, M.; GÖKGÖZ, M.; YİĞİTOĞLU, M. Immobilization of horseradish peroxidase on electrospun poly (vinyl alcohol)-polyacrylamide blend nanofiber membrane and its use in the conversion of phenol. *Polymer Bulletin*, v. 75, n.5, p. 1843-1865. 2017. <https://doi.org/10.1007/s00289-017-2129-5>

THOMPSON, M.; PENAFIEL, I.; COSGROVE, S. C.; TURNER, N. J. Biocatalysis using immobilised enzymes in continuous flow for the synthesis of fine chemicals. *Organic Process Research & Development*. 2018. <https://doi.org/10.1021/acs.oprd.8b00305>

THOMPSON, M.; PENAFIEL, I.; COSGROVE, S. C.; TURNER, N. J. Biocatalysis using immobilised enzymes in continuous flow for the synthesis of fine chemicals. *Organic Process Research & Development*. 2018. <https://doi.org/10.1021/acs.oprd.8b00305>

TIELAS, A.; GABRIEL, B.; SANTOS, C. S. C.; GARCIA, D.; JOSÉ ALCORTA, J.; BLANCHY, M.; BLANCO, M.; MENES, O.; GÁLVEZ, S.; NETO, V. "Nanomaterials - Guide for the SUDOE space industry"/"Nanomateriais -Guia para o espaço industrial SUDOE". 2014. E-book em Inglês (ISBN 978-989-99250-2-1), E-book em Português (ISBN 978-989-99250-1-4), Livro em papel em Português (ISBN 978-989-99250-0-7).

TIZCHANG, S.; KHIABANI, M. S.; MOKARRAM, R. R.; HAMISHEHKAR, H. Bacterial cellulose nano crystal as hydrocolloid matrix in immobilized β -galactosidase onto silicon dioxide nanoparticles. *LWT*, 109091. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109091>

TIZCHANG, S.; KHIABANI, M. S.; MOKARRAM, R. R.; HAMISHEHKAR, H.; MOHAMMADI, N. S.; CHISTI, Y. Immobilization of β -galactosidase by halloysite-adsorption and entrapment in a cellulose nanocrystals matrix. *Biochimica et Biophysica*

Acta (BBA)-General Subjects, v. 1865, n. 6, p.129896. 2021.
<https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2021.129896>

UBILLA, C.; RAMÍREZ, N.; VALDIVIA, F.; VERA, C.; ILLANES, A.; GUERRERO, C. Synthesis of Lactulose in Continuous Stirred Tank Reactor With β -galactosidase of *Apergillus oryzae* Immobilized in Monofunctional Glyoxyl Agarose Support. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8. 2020. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00699>

UGWUODO, C. J.; NWAGU, T. N. Stabilizing enzymes by immobilization on bacterial spores: A review of literature. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2020.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.10.171>

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

VENKATARAMAN, A.; AMADI, E. V.; CHEN, Y.; PAPADOPOULOS, C.. Carbon Nanotube Assembly and Integration for Applications. *Nanoscale Research Letters*, v. 14, n. 1, p. 220. 2019. <https://doi.org/10.1186/s11671-019-3046-3>

VERA, C.; GUERRERO, C.; ABURTO, C.; CORDOVA, A.; ILLANES, A. Conventional and non-conventional applications of β -galactosidases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, v. 140271. 2020.
<https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2019.140271>

VERA, C.; GUERRERO, C.; WILSON, L.; ILLANES, A. Optimization of reaction conditions and the donor substrate in the synthesis of hexyl- β -d-galactoside. *Process Biochemistry*, v. 58, p. 128-136. 2017.
<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2017.05.005>

VERA, C.; ILLANES, A. Lactose-derived nondigestible oligosaccharides and other high added-value products, in: A. Illanes, C. Guerrero, C. Vera, L. Wilson, R. Conejeros, F. Scott (Eds.), *Lactose Derived Prebiotics. A Process Perspective*, First Edit, Elsevier, New York, p. 87-110. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802724-0.00003-2>.

VERMA, M. L.; NAEBE M.; BARROW C. J.; PURI M. Enzyme immo-bilisation on amino-functionalised multi-walled carbon nanotubes: structural and biocatalytic haracterisation. 2013. *PLoS One* 8: e73642.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073642>

VOBĚRKOVÁ, S.; SOLČÁNY, V.; VRŠANSKÁ, M. ADAM, V. Immobilization of ligninolytic enzymes from white-rot fungi in cross-linked aggregates. *Chemosphere*, v. 202, p. 694-707. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.03.088>

WAHBA, M. I. Calcium pectinate-agar beads as improved carriers for β -d-galactosidase and their thermodynamics investigation. *3 Biotech*, v. 10, n. 8. 2020.
<https://doi.org/10.1007/s13205-020-02341-y>

WAHBA, M. I. Porous chitosan beads of superior mechanical properties for the covalent immobilization of enzymes. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 105, p. 894-904. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.07.102>

WAHBA, M. I. Sodium bicarbonate-gelled chitosan beads as mechanically stable carriers for the covalent immobilization of enzymes. *Biotechnology Progress*, v. 34, n. 2, p. 347-361. 2017. <https://doi.org/10.1002/btpr.2587>

WAHBA, M. I. Treated calcium pectinate beads for the covalent immobilization of β -d-galactosidase. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 91, p.877-886. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.06.044>

WANG, J.; GUO, X. Adsorption isotherm models: Classification, physical meaning, application and solving method. *Chemosphere*, 127279. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127279>

WANG, Y.; KIM, E.; LIN, Y.; KIM, N.; KIT-ANAN, W.; GOPAL, S.; AGARWAL, S.; HOWES, P. D.; STEVENS, M. M. Rolling Circle Transcription-Amplified Hierarchically Structured Organic-Inorganic Hybrid RNA Flowers for Enzyme Immobilization. *ACS Applied Materials & Interfaces*, (), acsami.9b04663-. 2019. <https://doi.org/10.1021/acsami.9b04663>

WANG, L.-L.; FAN, M.; XING, X.; LIU, Y.; SUN, S. Immobilization of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase on Fe₃O₄ magnetic nanoparticles and its application in histamine removal. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 205, p. 111917. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2021.111917>

WANG, M.; HUA, X.; YANG, R.; SHEN, Q. Immobilization of cellobiose 2-epimerase from *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* on commercial resin Duolite A 568. *Food Bioscience*, v. 14, p. 47-53. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2016.03.001>

WEI, Y.; LING, X.; ZOU, L.; LAI, D.; LU, H.; XU, Y. A facile approach toward preparation of sulfonated multi-walled carbon nanotubes and their dispersibility in various solvents. *Colloids Surf a Physicochem Eng Asp*, v. 482 p.507-513. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2015.07.005>

WOLF, M.; GASPARIN, B. C.; PAULINO, A. T. Hydrolysis of lactose using β -d-galactosidase immobilized in a modified Arabic gum-based hydrogel for the production of lactose-free/low-lactose milk. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 115, p. 157-164, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.04.058>

WOLF, M.; TAMBOURGI, E. B.; PAULINO, A. T. Stability of β -D-galactosidase immobilized in polysaccharide-based hydrogels. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 609, p. 125679. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2020.125679>

WONG, S. Y.; HARTEL, R. W. Crystallization in Lactose Refining-A Review. *Journal of Food Science*, v. 79, n. 3, p. R257-R272. 2014.

<https://doi.org/10.1111/1750-3841.12349>

WU, X.; LI, M.; LI, Z.; LV, L.; ZHANG, Y.; LI, C. Amyloid-graphene oxide as immobilization platform of Au nanocatalysts and enzymes for improved glucose-sensing activity. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 490, p. 336-342. 2017.

<https://doi.org/10.1016/j.jcis.2016.11.058>

WAHBA, M. I. Calcium pectinate-agar beads as improved carriers for β -d-galactosidase and their thermodynamics investigation. *3 Biotech*, v. 10, n. 8. 2020.

<https://doi.org/10.1007/s13205-020-02341-y>

WAHBA, I. M.; E. HASSAN, E. M. Novel grafted agar disks for the covalent immobilization of β -D-galactosidase. *Biopolymers*, v. 103, n. 12, p. 675-684. 2015.

<https://doi.org/10.1002/bip.22693>

XAVIER, J. R.; RAMANA, K.V.; SHARMA, R. K. β -galactosidase: biotechnological applications in food processing. *Food Biochem.*, v. 42, p.12564. 2018.

<https://doi.org/10.1111/jfbc.12564>

XIAO, Y.; ZHANG, Y.; XIAO, F. Comparison of several commonly used detection indicators of cell senescence. *Drug and Chemical Toxicology*, p. 1-6. 2018.

<https://doi.org/10.1080/01480545.2018.1551407>

XU, M.; JI, D.; DENG, Y.; AGYEI, D. Preparation and assessment of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) of β -galactosidase from *Lactobacillus leichmannii* 313. *Food and Bioproducts Processing*, v. 124, p. 82-96.2020. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2020.08.004>

YADAV, A.; PANDEY, S. K.; AGRAWAL, D. C.; MISHRA, H.; SRIVASTAVA, A.; KAYASTHA, A. M. Carbon nanotubes molybdenum disulfide 3D nanocomposite as novel nanoscaffolds to immobilize *Lens culinaris* β -galactosidase (Lsbgal): Robust stability, reusability, and effective bioconversion of lactose in whey. *Food Chemistry*, v. 297, p. 125005. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125005>

YAMAGUCHI, H.; KIYOTA, Y.; MIYAZAKI, M. Techniques for Preparation of Cross-Linked Enzyme Aggregates and Their Applications in Bioconversions. *Catalysts*, v. 8, n. 5, p. 174. 2018. <https://doi.org/10.3390/catal8050174>

YAN, X.; FAN, X.; WANG, Q.; SHEN, Y. An adsorption isotherm model for silver-loaded activated carbon adsorption performance. *Therm. Sci.*, v. 21 p. 48-48. 2017.

<https://doi.org/10.2298/TSCI151202048Y>

YANG, J.; RAINVILLE, P.; LIU, K.; POINTER, B. Determination of lactose in low-lactose and lactose-free dairy products using LC-MS. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 100, p. 103824, 2021.

<https://doi.org/10.1016/j.jfca.2021.103824>

YAO, Y.; ZHANG, Y.; YAN, C.; ZHU, W. H.; GUO, Z. Enzyme-activatable fluorescent probes for β -galactosidase: from design to biological applications. *Chem. Sci.*, n. 12, p. 9885-9894. 2021. <https://doi.org/10.1039/D1SC02069B>

YOU, S.; CHANG, H.; YIN, Q.; QI, W.; WANG, M.; SU, R.; HE, Z. Utilization of whey powder as substrate for low-cost preparation of β -galactosidase as main product, and ethanol as by-product, by a litre-scale integrated process. *Bioresource Technology*, v. 245, p. 1271-1276. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.08.092>

YU, L.; O'SULLIVAN, D. J. Immobilization of whole cells of *Lactococcus lactis* containing high levels of a hyperthermostable β -galactosidase enzyme in chitosan beads for efficient galacto-oligosaccharide production. *Journal of Dairy Science*, v. 101, n. 4, p. 2974-2983. 2018. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13770>

ZAAK, H.; PEIRCE, S.; ALBUQUERQUE, T.; SASSI, M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Exploiting the versatility of aminated supports activated with glutaraldehyde to immobilize β -galactosidase from *Aspergillus oryzae* Catalysts, v. 7, p. 250. 2017. <https://doi.org/10.3390/catal7090250>

ZAAK, H.; SASSI, M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. A new heterofunctional amino-vinyl sulfone support to immobilize enzymes: Application to the stabilization of β -galactosidase from *Aspergillus oryzae*. *Process Biochemistry*, v. 64, p. 200-205. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2017.09.020>

ZAHIRINEJAD, S.; HEMMATI, R.; HOMA EI, A.; DINARI, A.; HOSSEINKHANI, S.; MOHAMMADI, S.; VIANELLO, F. Nano-organic supports for enzyme immobilization: Scopes and perspectives. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 204, p. 111774. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2021.111774>

ZDARTA, J.; MEYER, A. S.; JESIONOWSKI, T.; PINELO, M. A general overview of support materials for enzyme immobilization: characteristics, properties, practical utility. *Catalysts*, v. 8, p. 92. 2018. <https://doi.org/10.3390/catal8020092>

ZHANG, B.; LI, P.; ZHANG, H.; WANG, H.; LI, X.; TIAN, L.; ALI, N.; ALI, N.; ZHANG, Q. Preparation of Lipase / Zn₃(PO₄)₂ hybrid nanoflowers and their catalytic performance as immobilized enzyme. *Chem. Eng. J.*, v. 291, p. 287 - 297. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2016.01.104>

ZHANG, Z.; ZHANG, R.; MCCLEMENTS, D. J. Lactase (β -galactosidase) encapsulation in hydrogel beads with controlled internal pH microenvironments: Impact of bead characteristics on enzyme activity. *Food Hydrocolloids*, v. 67, p. 85-93. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.01.005>

ZHOU, L.; LUO, X.; LI, J.; MA, L.; HE, Y.; JIANG, Y.; GAO, L. Meso-molding three-dimensionally ordered macroporous alumina: A new platform to immobilize enzymes with high performance. *Biochemical Engineering Journal*, v. 146, p. 60-68. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2019.03.002>

ŽIVKOVIĆ, I. L. T.; ŽIVKOVIĆ, L. S.; BABIĆ, B. M.; KOKUNEŠOSKI, M. J.; JOKIĆ, B. M., KARADŽIĆ, I. M. Immobilization of *Candida rugosa* lipase by adsorption onto biosafe meso/macroporous silica and zirconia. Biochemical Engineering Journal, v. 93, p. 73-83. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2014.09.012>

ZUCCA, P.; SANJUST, E. Inorganic Materials as Supports for Covalent Enzyme Immobilization: Methods and Mechanisms. Molecules, v. 19, n. 9, p. 14139-14194. 2014. <https://doi.org/10.3390/molecules190914139>

CAPÍTULO 3 – AVALIAÇÃO DE ESTRATÉGIAS DE IMOBILIZAÇÃO E ESTABILIZAÇÃO DE β -GALACTOSIDASE DE *Bacillus licheniformis*

O presente capítulo apresenta a enzima β -galactosidase e sua atividade hidrolítica na imobilização em suporte Duolite A 568. Foi estudado a influência do pH em elevadas concentrações da solução tampão Britton-Robinson (BR), bem como a influência conjunta do tampão BR e tempo de imobilização para análise do desempenho do biocatalisador imobilizado pelas respostas de atividade, rendimento, eficiência e recuperação da imobilização.

3.1 INTRODUÇÃO

A enzima β -galactosidase (EC 3.2.1.23), comumente denominada como lactase, tem grande interesse industrial, pois desempenha atividade hidrolítica muito importante em substratos contendo lactose. A β -galactosidase pode ser produzida por microrganismos de diferentes espécies como *Aspergillus niger*, *Bifidobacteria infantis*, *Thermus sp.*, *Lactobacillus reuteri*, *Aspergillus sp.*, *Kluyveromyces lactis*, *Bacillus sp.* (ABDEL et al., 2021; SILVÉRIO et al., 2018; GOMES et al., 2018).

As enzimas β -galactosidases são capazes de hidrolisar as ligações β -1,4-d-galactosídicas da lactose formando dois monossacarídeos, glicose e galactose. Esta enzima também catalisa a síntese de compostos oligossacarídeos, como galacto-oligossacarídeos (GOS), pelo controle cinético da reação da transgalactosilação da lactose, sendo uma atividade promissora, pois resulta em compostos de alto valor agregado que são de grande interesse para a indústria. Essa síntese está sendo ativamente investigada para a produção de outras moléculas de interesse que não sejam o GOS, como o uso de outros substratos, permitindo a síntese de ampla gama de compostos potencialmente atraentes, como: lactulose, alquil-galactosídeo-frutossil-galacto-oligossacarídeos (fGOS) (CARNEIRO et al., 2018; GUERRERO et al., 2015; VERA; ILLANES, 2016; VERA et al., 2020).

Para melhorar a estabilidade e a capacidade de reutilização das enzimas pode-se empregar estratégias de imobilização que possibilitem de maneira eficaz um melhor controle do processo de reação (RIBEIRO et al., 2021). Normalmente, enzimas imobilizadas são ligadas ao suporte por grupos funcionais como ácidos glutâmicos e aspárticos (grupo carboxílico), por cadeias laterais de lisina (grupo ϵ -amino) e cisteína (grupo tiol), portanto, é muito importante estudar a carga da superfície do material de suporte em condições variáveis,

por exemplo, temperatura, pH e concentração de eletrólitos para otimizar o processo de imobilização e aprimorar a estabilidade do biocatalisador (FRAAS ; FRANZREB, 2017; SIGURDARDÓTTIR et al., 2018).

Dois tipos de adsorção são definidos de acordo com a natureza das forças responsáveis pela formação da camada interfacial: Adsorção física (fisissorção) ou adsorção química (quimissorção). As interações fracas envolvidas na adsorção impedem a integridade estrutural das moléculas de enzima de serem alteradas, mantendo assim a sua atividade. A imobilização eficiente depende das propriedades físico-químicas dos materiais de suporte, como área superfície, tamanho da partícula, tamanho de poro e grupos funcionais de superfície (VERA; ILLANES, 2016; BRANDANI, 2020).

A adsorção de proteínas depende da interação eletrostática, ligações de hidrogênio, grupos funcionais ativos, incorporação de contra-íons mudanças conformacionais da proteína (JESIONOWSKI et al., 2014; WAHAB et al., 2021). Kujawa et al. (2021) referiram-se ao método de adsorção física como sendo a adição de uma solução de enzima, preparada em solução tampão adequada, ao suporte escolhido, sem haver qualquer modificação deste. Após a adsorção, o excesso da enzima não ligada é removido por lavagem.

Tizchang et al. (2021), imobilizaram β -galactosidase de *Bifidobacterium bifidum* por adsorção física em nanotubos de *halloysite*, em que a enzima adsorvida foi mais estável durante a catálise e armazenamento, com pH ideal de 7,5, temperatura ótima de 55°C, em que a enzima imobilizada reteve 75,8% da atividade inicial após 60 dias em comparação com 29,2% retida pela enzima livre e pode ser utilizada em até 12 ciclos.

Há de se mencionar que a adsorção pode ser afetada por fatores como tempo de adsorção, concentração de enzima, tamanho do poro do suporte, temperatura e principalmente pH, além de grupos funcionais específicos na superfície tanto da enzima quanto do suporte (WANG et al., 2021).

Os fatores de relevância que afetam a atividade e estabilidade enzimática são pH, temperatura e força iônica. As mudanças de pH podem desestruturar o formato tridimensional da enzima visto que podem provocar mudanças no estado de ionização (carga) dos aminoácidos em meios ácidos, básicos ou neutros, afetando a atividade enzimática e conseqüentemente modificando as características de adsorção, orientação e ligações eletrostáticas entre enzima-substrato (ZAHIRINEJA et al., 2021; SHARMA et al., 2021).

A natureza química do tampão é especialmente importante em investigações biológicas como solubilidade, estabilidade, interação com outros íons no sistema, e serve para ajustar e estabilizar o pH (JOCHEMS et al., 2011). A força molar está relacionada com a

capacidade tamponante adequada, pois quanto mais concentrado for um sistema tampão, maior será sua capacidade de estabilizar o pH, porém há de se considerar que a maioria das enzimas, por serem biológicas, se mantêm ativas em meios iônicos moderados (BISSWANGER, 2014).

A força iônica da solução afeta a atividade enzimática, isso é perceptível na catálise, a qual depende do movimento das moléculas carregadas em relação a carga de outros. Assim, tanto a ligação de substratos carregados nas enzimas quanto o movimento de grupos carregados dentro do sítio “ativo” catalítico das enzimas serão influenciados pela composição iônica do meio, tais como as interações eletrostáticas que desempenham um papel muito importante na conformação da proteína e a alta força iônica possivelmente poderá causar o enfraquecimento e a ineficiência dessas interações (TRUSCOTT, 2020).

Kuribayashi et al. (2021), avaliaram a imobilização β -galactosidase de *Bacillus licheniformis* adsorvida em suporte Duolite A 568 em diferentes tampões e forças iônicas em pH 4,0 utilizando de concentração da enzima em 43 mL L⁻¹ estas foram as condições obtidas maximizadas. Destes resultados os autores inferiram uma melhor atividade enzimática utilizando-se de valores de tampão BR superiores a 200 mM em pH baixo de 4,0 devido ao ponto de sela obtido em superfície de resposta e concluíram que o pH, força iônica e a concentração da enzima na solução de imobilização tem influência significativa na atividade enzimática retida no processo de imobilização. Devido a estas inferências obtidas o presente estudo foi impulsionado a ser realizado.

Impulsionada pela justificativa apresentada anteriormente o objetivo do presente trabalho foi investigar a atividade e estabilidade da enzima β -galactosidase de *Bacillus licheniformis* adsorvida em suporte Duolite A 568 empregando soluções de imobilização com diferentes concentrações de forças iônicas do tampão Britton-Robinson (BR) e diferentes tempos de imobilização.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Enzima β -galactosidase de *Bacillus licheniformis*

A enzima utilizada foi a β -galactosidase de *Bacillus licheniformis*, em estado líquido. A enzima da marca Novozymes (Bagsværd, Dinamarca) foi cedida pela empresa Granolab/Granotec Nutrição e Biotecnologia (Araucária, Brasil) e Cemil (Cooperativa Central Mineira de Laticínios Ltda, Patos de Minas, Brasil). Segundo as especificações do fabricante,

as condições adequadas de trabalho são: pH na faixa de 4,2 a 9,0 e temperatura entre 2 e 50°C, para utilização na forma livre. Nas condições de pH 6,5 (tampão láctico), temperatura de 25°C e solução 50 gL⁻¹ de lactose a enzima β-galactosidase de *Bacillus licheniformis* apresentou atividade enzimática/mL de solução de 4432 U/(μmol.min⁻¹).

3.2.2 Resina Duolite A 568

O suporte usado na imobilização da enzima foi a resina de fenol-formaldeído Duolite A 568, sendo caracterizada por ser 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 adsorção formada com ligações de hidrogênio e forças de Van der Waals (KURIBAYASHI et al., 2021). Esta resina foi cedida pela Dow Chemical Company (Califórnia, Estados Unidos) e apresenta tamanho de poro de 15 a 25 nm, porosidade de 0,78-1,0 mL g⁻¹ e densidade de 1,10 a 1,14 g mL⁻¹. A imagem da resina Duolite A 568 é apresentada na Figura 3.1.

Figura 3. 1 – Aspecto da resina Duolite A 568.



Fonte: Elaborado pela autora (2022)

A ativação da resina Duolite A 568 seguiu a metodologia descrita pelo fabricante, que consistiu em submergir o suporte em solução de ácido clorídrico 1 M, na razão de dez volumes de solução por volume de resina, durante 30 minutos em incubadora rotativa a 150 rpm. Seguindo do mesmo procedimento com solução de hidróxido de sódio 1 M, nas mesmas

condições empregadas para o tratamento com ácido, sendo realizado a lavagem da resina por 5 vezes com 100 mL de água destilada, entre os tratamentos. Ao final a resina era novamente lavada com água destilada e em seguida filtrada à vácuo, seca naturalmente à temperatura ambiente (aproximadamente 25°C).

3.2.3 Imobilização da β -galactosidase

Para o processo de imobilização a quantidade de resina em cada condição experimental foi de 0,5 gramas, que por meio do método de adsorção física foi incubada com quantidade de 43 mL L⁻¹ de enzima em 10 mL de solução tampão BR em força iônica e pH variáveis de acordo com cada experimento, em temperatura ambiente de 25°C e agitação de 150 rpm em mesa rotativa. Após o período de tempos variados de acordo com cada experimento, foi realizado as reações em reator encamisado. No tempo final determinado para cada imobilização, a enzima imobilizada foi separada da solução e lavada com tampão láctico pH 6.5 por meio de cesta pequena adaptada com formato de cilindro de malha de aço fina de aproximadamente 10 cm, realizando-se medidas da atividade enzimática do imobilizado e da fração líquida contendo tampão e enzima não imobilizada (KURIBAYASHI et al., 2021). Nos experimentos em que se observou a formação de aglomerados, os mesmos foram separados do sobrenadante com ajuda de micropipeta.

A unidade de atividade de imobilização foi definida como a quantidade de enzima que libera em 1 μ mol de glicose produzida por minuto de reação, nas condições do ensaio. As atividades foram expressas em μ mol mg⁻¹ min⁻¹, representado por (U).

3.2.4 Influência do pH e de elevadas concentrações da solução de tampão Britton-Robinson (BR) na imobilização

Foi realizado um estudo exploratório da influência da força iônica pela utilização de elevadas concentrações da solução tampão Britton-Robinson 300, 500 e 1000 mM com variação de pH em temperatura 25°C.

Essa investigação foi impulsionada pelo estudo de Kuribayashi et al. (2021), que inferiu a possibilidade do aumento de atividade enzimática no processo de imobilização com o aumento da concentração do tampão utilizado. Desta forma foi realizado, em caráter exploratório, a avaliação do emprego do tampão Britton-Robinson (BR) de diferentes concentrações, variando de 300 mM a 1000 mM em pH de 3,5; 4,0 e 4,5, tempo de

imobilização de 2 horas à temperatura ambiente de 25°C para a imobilização da β -galactosidase de (*B. licheniformis*) em Duolite A 568, com repetição em triplicata.

3.2.5 Influência conjunta da concentração da solução do tampão BR e do tempo de imobilização na atividade da enzima imobilizada

Com base no estudo anterior avaliou-se a utilização de valores menores de concentração da solução tampão durante o processo de imobilização empregando um planejamento composto central rotacional (PCCR), conforme Tabela 3.1.

Tabela 3. 1 – Matriz do Planejamento Composto Central Rotacional do efeito da força iônica e Tempo da solução de imobilização.

Fatores	Níveis				
	$-\alpha$	-1	0	+1	$+\alpha$
Força Iônica (mM)	5,12	19	52,5	86	99,88
Tempo (h)	0,46	1,3	3,3	5,3	6,13

$$\alpha = \pm 1,41$$

Fonte: Elaborado pela autora (2022).

O Planejamento Composto Central Rotacional (PCCR) foi elaborado com três réplicas centrais, totalizando 11 experimentos com α igual a 1,41, incluindo duas variáveis independentes: força iônica (mM) e o tempo de imobilização (h), e variáveis dependentes de saída: atividade da enzima imobilizada (U) e parâmetros da imobilização (rendimento, eficiência e recuperação). Os experimentos foram realizados com pH 4,0 para todos os ensaios. Os resultados foram analisados por meio do software *Statistica*® 12.0

3.2.5.1 Determinação da atividade enzimática

A unidade experimental (Figura 3.2) utilizada para determinação da atividade enzimática consistiu de um reator tipo batelada, encamisado, com capacidade 200 mL, acoplado a um banho termostático e agitador magnético.

A determinação da atividade enzimática foi feita após o tempo de imobilização pré-determinados. As reações de determinação da atividade enzimática para a enzima livre, imobilizada e sobrenadante da imobilização ocorreram com 5 mL de solução enzimática,

enzim imobilizada, sobrenadante e enzima livre. Para a enzima ligada ao suporte as reações foram feitas com toda resina (0,5 g), em 75 mL de solução tampão láctico em pH 6,5 com 50 g L⁻¹ de lactose. A unidade experimental da reação enzimática está demonstrada na Figura 3.2.

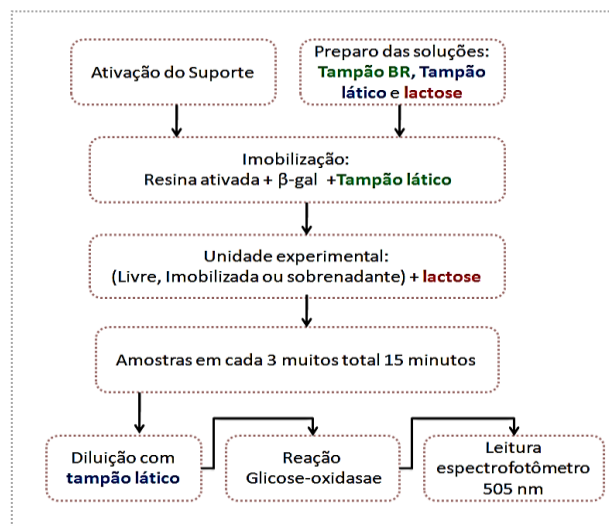
Figura 3. 2 – Unidade experimental: reação enzimática de hidrólise de lactose por β -galactosidase (*B. licheniformis*).



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Para cada experimento foram coletadas cinco amostras do meio reacional em intervalo de três minutos, totalizando 15 minutos de reação. Os experimentos para a enzima imobilizada foram realizados em duplicata. O fluxograma da imobilização enzimática está demonstrado na Figura 3.3.

Figura 3. 3 – Fluxograma da imobilização enzimática de β -galactosidase (*B. licheniformis*) em Duolite A568.



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

A atividade enzimática foi determinada através do método das taxas iniciais, pela quantificação de glicose formada ao longo da reação pelo método enzimático glicose-oxidase (RABA; MOTTOLA, 1995).

Foram realizados os cálculos de rendimento da imobilização, eficiência da imobilização e a recuperação da atividade enzimática, conforme Equações 3.1, 3.2 e 3.3, respectivamente, para determinar o êxito do processo de imobilização, conforme descrito por Sheldon e Van Pelt (2013). O rendimento da imobilização é utilizado para caracterizar a porcentagem de atividade da enzima livre que é de fato imobilizada. A eficiência descreve a porcentagem de enzima ligada que possui atividade observada no imobilizado. O cálculo da recuperação da atividade representa o percentual da atividade enzimática inicial que foi imobilizada na forma ativa.

$$\text{Rendimento de imobilização} = \frac{\text{Atividade imobilizada}}{\text{Atividade inicial}} \times 100 \quad (3.1)$$

$$\text{Eficiência de imobilização} = \frac{\text{Atividade observada}}{\text{Atividade imobilizada}} \times 100 \quad (3.2)$$

$$\text{Recuperação da atividade} = \frac{\text{Atividade observada}}{\text{Atividade inicial}} \times 100 \quad (3.3)$$

Sendo,

Atividade observada = Atividade da enzima imobilizada;

Atividade imobilizada = Atividade da enzima livre - Atividade do sobrenadante;

Atividade inicial = Atividade da enzima livre.

3.3 RESULTADO E DISCUSSÃO

3.3.1 Efeito de elevadas concentrações da solução do tampão BR na imobilização

Os resultados da atividade enzimática para os experimentos propostos com concentrações elevadas da solução de tampão BR, em diferentes condições de pHs, estão apresentados na Tabela 3.2.

Tabela 3. 2 – Resultados da atividade enzimática em diferentes concentrações de tampão BR em diferentes condições de pH utilizados na imobilização.

Atividade enzimática (U)	Tampão Britton-Robinson				
	pH 3,5	pH 4,0	pH 4,5	pH 4,0	pH 4,0
	300 mM	300 mM	300 mM	500 mM	1000 mM
Imobilizada	278±1,30	321±4,10	282±2,96	163±1,85	76±0,77
Sobrenadante	520±3,68	328±3,32	464±2,69	290±1,65	94±0,41
Livre	91±0,37	650±3,35	932±4,97	267±1,35	-
Aglomerado*	86±0,42	719±3,97 ⁽ⁱ⁾	767±4,19 ⁽ⁱⁱ⁾	348±2,13 ⁽ⁱⁱⁱ⁾	-

A* = (sobrenadante) grânulos ligados como aglomerados que foram formados durante o tempo de imobilização da β -galactosidase com suporte Duolite A 568; ⁽ⁱ⁾ Grânulos maiores = atividade do restante do meio reacional; ⁽ⁱⁱ⁾ Grânulos em traços finos de aglomerados = atividade do restante do meio reacional; ⁽ⁱⁱⁱ⁾ Grânulos menores e compactados = atividade do restante do meio reacional.

Fonte: Elaborado pela autora (2022).

É possível observar, analisando a Tabela 3.2, que os melhores resultados de atividade enzimática para a enzima imobilizada foram obtidos em solução tampão com concentração de 300 mM, variando de 321 U em pH 4,0 a aproximadamente 280 U para os pHs 3,5 e 4,5. A variação entre esses resultados é cerca de 10% na atividade enzimática, indicando que a mudança de pH (na faixa estudada) não acarretou melhora nos resultados de atividade enzimática.

Para as soluções tampão de 500 e 1000 mM, foram observadas reduções expressivas, de ~ 50% e 76% em relação à maior atividade da enzima imobilizada de 321 U, resultando em 163 U e 76 U, respectivamente.

Analisando os resultados, pode-se observar que as concentrações de tampão em alta força iônica não implicaram em aumento da atividade enzimática imobilizada, ao contrário, observou-se inativação da enzima em condição que pode ser considerada extrema, visto que não foi detectada a atividade na solução de enzima livre para a maior concentração de tampão BR 1000 mM.

Em tampão BR de 1000 mM em pH 4,0, não foi observado atividade enzimática para a enzima livre, já para a enzima imobilizada foi obtido atividade enzimática baixa entre 76 U e 94 U demonstrando que, de alguma forma, o suporte atribuiu algum tipo de tolerância ao meio, pois o imobilizado apresentou uma pequena atividade enzimática de 76 U e também foi encontrado 94 U no sobrenadante. Tal comportamento não era esperado, já que não foi encontrado nenhuma atividade para enzima livre. Supostamente algum efeito interativo no

próprio processo de imobilização com a presença do suporte pode ter provocado alguma alteração no pH, ou alteração nas cargas do tampão dando a enzima adaptação ao microambiente. Pode-se salientar que o meio interno para enzimas imobilizadas é afetado pelas propriedades químicas do material sólido e pela interação de reação e difusão da enzima ao suporte.

Nestas concentrações de alta força iônica utilizadas no presente estudo obteve-se redução na atividade da enzima, como já foi mencionado. Este fato foi observado também por Pessela et al. (2005) que imobilizaram diferentes enzimas, inclusive a β -galactosidase de *Aspergillus oryzae*, em suportes de agarose recobertos com polietilenoimina de alto tamanho molecular (PEI), utilizando diferentes forças iônicas (5 a 700 mM de cloreto de sódio (NaCl)). No estudo dos autores, foi observado que, quando a força iônica era aumentada, a taxa de adsorção baixa, como também utilizando concentrações salinas acima de 100 mM, ou seja, o processo conduzido em força iônica elevada implicou em diminuição no rendimento de imobilização.

Com estes resultados exploratórios observou-se que a força iônica e pH influenciaram no microambiente de imobilização, e que possivelmente uma melhor atividade da enzima possa ser encontrada em força iônica mais baixa. Tal observação corrobora com Eslamipour e Hejazi (2015), que investigaram os efeitos de modificação e ativação da superfície de nanopartículas magnéticas de óxido férrico (MNPs) na imobilização da amilase sendo realizado, primeiramente, o mecanismo de adsorção física, seguido da formação da ligação covalente entre a enzima e as MNPs revestidas, sob diferentes condições de força iônica (5, 100 e 500 mM). A alta taxa de imobilização em baixa concentração de tampão (5 mM) indicou maior potencial do suporte para formação de ligações por meio desse mecanismo. Os resultados mostraram que a atividade da amilase foi maior em imobilizações feitas em baixas concentrações de tampão. Albuquerque et al. (2016) pesquisaram a imobilização de β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* em esferas de agarose MANAE, que foi imobilizada em diferentes valores de pH e em diferentes forças iônicas (5 a 50 mM tampão acetato de sódio em pH 4,5 a 55°C, fosfato de sódio a pH 7 a 50°C, e carbonato de sódio a pH 9 em 36°C). Nos resultados, a imobilização no suporte MANAE permitiu manter um nível muito alto de atividade enzimática nos 3 valores de pH de imobilização usados (75–85%). Em crescente uso de concentração de tampão de acordo com os autores foi observado que um aumento do tampão enfraqueceu os efeitos do suporte com a enzima em estabelecer novas interações e que também pode quebrar algumas das pontes iônicas já formadas.

Outro fator relacionado a baixa atividade enzimática, encontrado neste estudo, pode estar também relacionado a desnaturação da enzima quando utilizado alta força iônica, ou seja, um nível excessivo de concentração de tampão BR, o que acelerou o processo de desnaturação da proteína gerando o fenômeno denominado de *salting-out*. Tal fato foi observado por Lai et al. (2016), que imobilizaram moléculas de tripsina (EC 3.4.21.4) em microesferas P (NIPAM-co-AA) (*N*-isopropilacrilamida NIPAM), e investigaram vários parâmetros, como: valor de pH (5,0–10,0) de imobilização, concentração de enzima tripsina (1–6 mg mL⁻¹), concentração de solução tampão fosfato PBS (10–70 mM) e tempo de imobilização de 2 a 14h, com o objetivo de se obter a maior atividade da tripsina imobilizada. Em resposta, observaram que a quantidade de enzima aumentou a atividade enzimática quando variaram de 10 a 40 mM, no entanto uma diminuição foi observada depois que a concentração de PBS excedeu 50 mM. Os pesquisadores observaram que o principal motivo para estes resultados foi a concentração da solução tampão que afetou as interações eletrostáticas entre o suporte e a enzima, causando a desnaturação.

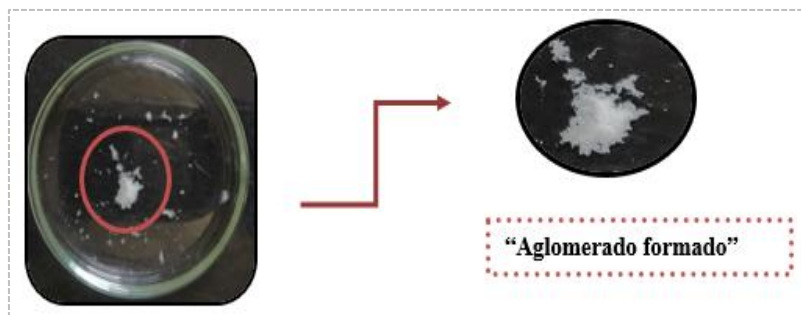
Analisando os resultados de atividade nos sobrenadantes obteve-se valores maiores (520, 328, 464, 290 e 94 U) de atividade enzimática, comparado aos valores menores (278, 321, 282, 168 e 76 U) de imobilização, respectivamente, ou seja, pode-se notar que as enzimas não se ligaram devidamente ao suporte. No processo de imobilização deve-se buscar um equilíbrio para alguns fatores, como força iônica, pH, concentração enzimática, entre outros, para que a atividade da enzima ligada ao suporte apresente um bom desempenho durante o processo. De acordo com Hoarau et al. (2017), vários fatores influenciam a imobilização de enzimas pois a superfície de um suporte e da enzima nunca é "neutra" e sempre afeta os processos físico-químicos, ou seja, efeitos intrínsecos podem influenciar as cargas na superfície da enzima e suas interações como: efeitos de superfície, a concentração local de solutos, incluindo íons de tamponamento e substratos.

Durante a realização dos experimentos observou-se que no meio reacional do processo de imobilização, ocorreu a formação de um tipo de estrutura branca que se ligava em porções consideráveis umas às outras como grânulos interligados, formando aglomerados.

Os aglomerados foram recolhidos para determinação da atividade enzimática e os resultados obtidos foram interessantes. Observou-se que alguns experimentos apresentaram atividades enzimáticas consideravelmente expressivas com valores de 719 U (300 mM pH 4,0), 767 U (300 mM em pH 4,5) e 348 U (500 mM e pH 4,0), sendo considerado neste trabalho um resultado promissor, capaz de dar rumo a novas pesquisas e avanços em técnicas de imobilização livre de suporte. Esses resultados foram obtidos do sobrenadante de

imobilização com algumas características peculiares destes aglomerados (grânulos), como demonstrado na Figura 3.4.

Figura 3. 4 – Aglomerado (grânulos interligados) formado no meio reacional durante a imobilização.



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Na atividade de imobilização que resultou no valor de 719 U (300 mM pH 4,0), os aglomerados formaram “grânulos maiores”, apresentando a ocorrência de uma precipitação de enzimas que não se ligaram ao suporte, possivelmente isso pode ter ocorrido pela alta concentração de força iônica do tampão em um pH mais ácido. Esta abordagem de imobilização sem suporte, como agregados enzimáticos ligados (CLEAs), é encontrada por Xu et al. (2020) que pesquisaram as enzimas β -galactosidases de *Lactobacillus leichmannii* 313 (LL 313), que foram imobilizadas pela primeira vez pela tecnologia de agregados enzimáticos reticulados (CLEA) em condições de pH ideal (7,0), temperatura (55°C). Os pesquisadores utilizaram três diferentes precipitantes (sulfato de amônio saturado-ASF), acetona-ACT e isopropanol-IPA, avaliando o desempenho em comparação com a enzima bruta, e em resposta a pesquisa, todos os tipos de CLEA exibiram a capacidade de hidrolisar lactose e gerar GOS com recuperação de atividades de 23% (ASF-CLEA), 18% (ACT-CLEA), 13,6% (IPA-CLEA), e ainda concluíram que o sistema enzimático resultante tem aplicações promissoras na indústria de alimentos.

Outro relato da utilização de enzimas imobilizadas sem suportes foi mostrado por Primožič et al. (2020), que estudaram enzimas imobilizadas, sem suporte em lacase, usando dois tipos diferentes de imobilização: agregados enzimáticos reticulados (CLEAs) e agregados enzimáticos reticulados magnéticos (mCLEAs). Em comparação com a lacase nativa, os autores relataram que ambas as formas imobilizadas de lacase têm potencial para serem usadas em tecnologias industriais mais limpas como, por exemplo, no tratamento biológico de águas residuais.

O experimento que resultou em atividade enzimática de 767 U (300 mM em pH 4,5), foi observado que houve aglomerações em “traços finos de grânulos”, dispersos no sobrenadante. E devido à alta atividade observada é possível que o microambiente tenha favorecido a enzima, que mesmo não se ligando ao suporte permaneceu ativa. Outro ponto importante e de se observar é que esses experimentos, que apresentaram estas aglomerações, não foram usados nenhum tipo de agente precipitante, e estes aglomerados foram formados apenas com a combinação de concentração do tampão e pH, ocasionando tal efeito. Em pesquisas futuras estes aglomerados poderão ser reticulados e utilizados em processos de imobilizações sem suporte.

Em relação à condição experimental de 500 mM de tampão e pH 4,0, observou-se uma queda de atividade bem acentuada de 348 U, sendo que as condições de imobilização não foram favoráveis a enzima, e que os aglomerados formados no sobrenadante mostraram-se “grânulos menores e “compactados” com valores obtidos menos ativos, possivelmente uma desnaturação irreversível possa ter ocorrido. Estas inferências são relatadas no trabalho de Braga et al. (2014), que avaliaram a imobilização da β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* em diferentes quantidades do suporte (200 - 400 mg), pH (6,5 - 7,5), força iônica do tampão (fosfato de potássio) em uso (0,5 - 1,5 mol L⁻¹), e tempo de reação (2 - 8 h). Os pesquisadores concluíram que nem toda a enzima ligada ao suporte é biologicamente ativa, e que pode ser que durante a imobilização da enzima ocorra impedimento estérico ou desnaturação da enzima quando uma maior molaridade, de 2,5 mol L⁻¹, foi utilizada. Por outro lado bons rendimentos, com base na atividade de β -galactosidase (22%) e com base na imobilização (69,3%), foram obtidos quando o 2,0 mol L⁻¹ de tampão foi utilizado.

3.3.2 Influência conjunta da concentração de tampão BR e do tempo na imobilização

Na Tabela 3.3 estão apresentados os resultados da influência conjunta da força iônica e do tempo na imobilização, bem como as variável dependente, como a atividade enzimática e o efeito das variáveis rendimento, eficiência e recuperação do biocatalisador imobilizado em valores reais e codificados, em condições de concentração da enzima de 43 mL L⁻¹, tampão BR em pH 4,0.

Tabela 3. 3 – Matriz do PCCR com valores reais e codificados do efeito da força iônica e tempo e na resposta dependente de atividade enzimática.

Experimentos	* Força Iônica (mM)	Tempo (horas)	**AE (U)
1	19 (-1)	1,3 (-1)	398
2	19 (-1)	5,3 (+1)	328
3	86 (+1)	1,3 (-1)	114
4	86 (+1)	5,3 (+1)	470
5	5,12 (- α)	3,3 (0)	396
6	99,8 (+ α)	3,3 (0)	340
7	52,5 (0)	0,46 (- α)	182
8	52,5 (0)	6,12 (+ α)	418
9	52,5 (0)	3,3 (0)	330
10	52,5 (0)	3,3 (0)	319
11	52,5 (0)	3,3 (0)	328

*Força Iônica = Tampão Britton-Robinson (BR).

**AE = Atividade enzimática do biocatalisador imobilizado.

Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Estatisticamente foi realizado a regressão múltipla para descrever e explicar a relação entre as variáveis independentes, ou seja, a capacidade de determinar a influência relativa de das variáveis preditoras, força iônica (mM) e tempo de imobilização (horas), e a variável dependente, atividade enzimática do biocatalisador (U), proporcionada pela imobilização da enzima β -galactosidase de *Bacillus licheniformis* em Duolite A 568.

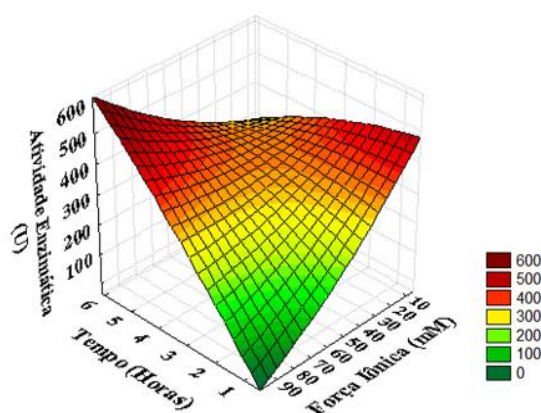
O modelo matemático mostrou-se significativo considerando um nível de significância de 5% ($p < 0,05$), conforme Equação 3.4, com as variáveis significativas.

$$AE = 325,667 - 55,2990X_1 + 39,0833X_1^2 + 154,938X_2 + 213,00X_1 \cdot X_2 \quad (3.4)$$

O coeficiente de determinação (R^2) foi de 99,1%, e demonstrou que a variabilidade dos dados foi explicada pela equação experimental obtida, sugerindo que o modelo possui um bom ajuste aos dados empíricos. Em análise aos resultados, a distribuição de resíduos se comportou de forma aleatória em torno zero, sem tendências na distribuição.

Com o modelo foi possível gerar o gráfico de superfície de resposta, conforme Figura 3.5.

Figura 3. 5 – Superfície de resposta da influência de força iônica e do tempo na atividade da enzima imobilizada.



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Pela análise da superfície de resposta, conforme Figura 3.5, verifica-se interação entre força iônica de tampão BR e o tempo de imobilização. Nos experimentos que utilizaram maiores concentrações de tampão associados a menores tempos observou-se que atividade observada foi baixa. Entretanto quando se utilizou valores extremos na faixa estudada entre 52,5 a 99,8 mM de força iônica do tampão combinados aos maiores tempos de 5,3 e 6,12 horas, obteve-se os maiores valores de atividade enzimática que foram de 470 U e 418 U (86 mM em 5,3h e 52,5 mM em 6,12h) respectivamente, por outro lado foi observado que também obteve-se bons resultados ao emprego de menor concentração de tampão juntamente a tempos reduzidos.

Nos experimentos conduzidos a tempos iguais (3,3 horas), pode-se observar, que em força iônica baixa (5,12 mM) obteve-se melhor resultado de atividade enzimática (418U) quando comparado com o processo de imobilização em que foi empregado alta concentração da solução tampão (99,8 mM), em que atingiu atividade de 340 U. Sendo assim a alta concentração da solução tampão não melhorou a ligação da enzima ao suporte, ocasionando redução da atividade enzimática, supostamente não houve muitas ligações de enzima ao suporte ou houve maior desnaturação da enzima.

A atividade da enzima imobilizada variou de 114 U a 470 U quando empregada a concentração do tampão de 86 mM e tempo de imobilização ampliado de 1,3 para 5,3h. Este mesmo comportamento foi observado quando mantido a força iônica em 52,5 mM, que resultou em aumento na atividade enzimática de aproximadamente 2,3 vezes quando o tempo variou de 0,46 a 6,12h de imobilização.

A imobilização realizada com força iônica de 19 mM em 1,3 horas resultou em 398 U de atividade enzimática em condições de baixa concentração de solução tampão em tempo bem reduzido, o que representa cerca de 85% da atividade máxima observada neste estudo. Desta forma neste experimento utilizando-se de um menor tempo em menor concentração de solução tampão e obteve-se uma atividade enzimática relativamente alta, podendo ser um dado importante e interessante industrialmente, pela redução de custos, pois a solubilidade de enzimas livres torna seu uso, em larga escala, relativamente caro, uma vez que sua recuperação em meio a soluções contendo substrato, produtos e outros componentes é complexa (GENNARI et al., 2018). Outra vantagem é de se ter uma boa estabilidade do biocatalizador e facilidade de remoção do meio reacional, tornando os processos mais sustentáveis e rentáveis economicamente.

O uso de menor força iônica e tempo reduzido com bons resultados e atividade enzimática como obtidos nesta pesquisa concorda como trabalho de Lee et al. (2010) que pesquisaram os efeitos de diferentes soluções de tampão e força iônica, na imobilização de lipase de *Candida rugosa* e *Rhizopus oryzae*, tampões como fosfato de sódio (SP), fosfato de potássio (PP), 3-(*N*- ácido morfolino) propano-1-sulfônico (MOPs) e 2-amino-2-hidroximetil-tampão propano-1,3-diol (Tris). Estes tampões foram utilizados com forças iônicas variando de 0,1 M a 1,25 M, durante 30 minutos a 37°C. Nos resultados, a atividade da lipase nos tampões MOPs foi maior do que a atividade da lipase em outros tampões em todas as faixas de pH testadas, além disso, o tampão ideal e a força iônica para a imobilização de lipase de *R. oryzae* foram observados quando uma mistura de MOPs 0,25 e 1,25 M de tampão SP M foi usada, pois as atividades das enzima imobilizadas aumentaram de 600 para 900 U/g quando ao foi usado a força iônica de 0,25 M, em contra partida a atividade da enzima diminuiu de 850 a 600 U/g quando usado a força iônica de 1,25 M. Os pesquisadores concluíram que essa diminuição ocorreu porque em alta força iônica acarreta o efeito desidratador das moléculas de sal que cercam a enzima permitindo que as interações hidrofóbicas ocorram.

Os resultados promissores de atividade enzimática obtido no experimento em baixa concentração iônica do tampão (19 mM e 1,3h), pode supostamente estar relacionado a conformação da estrutura da enzima que permaneceu ativa sem alterações quando adsorvida ao suporte, tal inferência está de acordo com estudos realizados por Alves et al. (2017), que estudaram a imobilização de lipase de *Thermomyces lanuginosus* (TLL) por meio de adsorção física, em resina mesoporosa, utilizando tampão acetato de sódio de 5-200 mM, em pH 5,0, e concluíram que a imobilização em baixa força iônica, de 5 mM, evitou possíveis mudanças de conformação na estrutura tridimensional da enzima em seu ponto isoelétrico.

Soares et al. (2014) estudaram o processo de imobilização de lipase de *Aspergillus niger*, por adsorção, em dois diferentes suportes: fibra de coco e octil-agarose utilizando tampão fosfato de sódio de pH 7,0 de 5 e 50 mM, com tempo de contato enzima-suporte de 1 hora. Os pesquisadores relataram que o uso de baixa força iônica se mostrou mais eficiente na adsorção da enzima ao suporte tanto em suporte heterogêneo (fibra de coco) quanto em suporte homogêneo (octil-agarose), sendo o suporte homogêneo (octil-agarose) que apresentou maior atividade lipolítica (3,2 UAO/g) em 1 hora de contato.

Carević et al. (2016), estudaram o estabelecimento de um protocolo de imobilização eficiente para β -galactosidase de *Aspergillus oryzae*, na resina macroporosa poliestirênica Purolite® A-109, via adsorção para melhor utilização de sua atividade de transgalactosilação. Os pesquisadores utilizaram para o estudo variações de tampão de 0,1 M e 1 M em diferentes pHs. Em seus resultados a imobilização conduzida em tampões de força iônica mais alta renderam preparações consideravelmente menos ativas dentro de toda a faixa de pH usada (pH 4-7), em comparação com aqueles realizados em tampões de baixa molaridade, pH inferiores (4,0 e 5,0) que apresentaram maior influência na taxa de imobilização.

Em outra pesquisa que corrobora com os dados observados neste trabalho é relatado em Manoel et al. (2015), que pesquisaram os efeitos da força iônica na taxa de imobilização no que diz respeito a abertura ou fechamento de lipases adsorvidas. Duas enzimas foram estudadas, a lipase de *Thermomyces lanuginosus* (TLL) e a lipase de *Pseudomonas cepacia* (PCL), em grânulos de agarose de octil e brometo de cianogênio (CNBr), respectivamente, utilizando diferentes concentrações de solução tampão de fosfato de sódio de 10 mM a 1 M, e concluíram que a taxa de imobilização em octil-agarose foi retardada com o aumento da força iônica.

Ducas et al. (2016) imobilizaram lipase microbiana de *Thermomyces lanuginosus* (TLL) por meio de adsorção física em poli-(estireno-divinilbenzeno), o efeito da força iônica nas propriedades catalíticas dos biocatalisadores foi avaliado com força iônica (tampão de acetato de sódio) variando de 0 a 200 mM a 25°C em tempo de 12h. Os melhores resultados foram próximos ao ponto isoelétrico (pH 5,0) em baixa força iônica (tampão 5 mM de acetato de sódio) que permitiu uma melhor conformação da enzima com o suporte.

Vazquez-Ortega et al. (2018) que pesquisaram a estabilização de β -galactosidase dimérica de *Aspergillus niger* via imobilização por troca iônica em diferentes esferas de amino-agarose em pH 5 e 7, utilizando glutaraldeído sob diferentes condições. As enzimas imobilizadas foram incubadas em concentrações crescentes de NaCl (75 mM, 300 mM e 1000 mM) em pH 7. Os resultados indicaram que a maioria das moléculas de enzima foram

liberadas para o meio quando empregadas concentrações de NaCl (Cloreto de sódio) de força iônica de 1000 mM, neste caso desfavorecendo a ligações de enzima ao suporte.

Com o exposto e analisando os resultados obtidos nesse trabalho foi observado que as primeiras ligações entre as moléculas de enzima em suporte ativado ocorreram rapidamente. Possivelmente em baixa concentração de solução tampão contribuiu com aumento de maior taxa de difusão para a superfície do suporte. Este fenômeno pode ser descrito como modelo de difusão intrapartícula relatado por Gonçalves et al. (2007) que pesquisaram sobre os efeitos de transferência de massa para a síntese de ampicilina e amoxicilina, catalisada pela penicilina G acilase imobilizada em agarose. Os autores apontaram que o sistema foi influenciado pela transferência de massa e que as difusividades eficazes ocorrem via difusão do adsorbato nos poros do suporte.

3.3.3 Análise do processo de imobilização pelas respostas rendimento, eficiência e recuperação da imobilização

Para um melhor entendimento do processo de imobilização, três parâmetros são continuamente utilizados que são: rendimento da imobilização, eficiência da imobilização e recuperação da atividade (SHELDON; VAN PELT, 2013). Os resultados do rendimento, eficiência e recuperação estão apresentados na Tabela 3.4.

Tabela 3. 4 – Valores reais e codificados do efeito da força iônica (tampão BR) e tempo e as respostas dependentes do rendimento, eficiência e recuperação.

Experimentos	Força Iônica (mM)	Tempo (horas)	Rendimento (%)	Eficiência (%)	Recuperação (%)
1	19 (-1)	1,3 (-1)	46,45	86,90	40,37
2	19 (-1)	5,3 (+1)	94,15	84,97	80,00
3	86 (+1)	1,3 (-1)	73,70	16,15	11,90
4	86 (+1)	5,3 (+1)	91,01	96,71	88,01
5	5,12 (- α)	3,3 (0)	74,88	83,54	62,56
6	99,8 (+ α)	3,3 (0)	89,42	51,59	46,13
7	52,5 (0)	0,46 (- α)	19,76	93,33	18,44
8	52,5 (0)	6,12 (+ α)	92,72	96,54	89,51
9	52,5 (0)	3,3 (0)	89,98	55,65	50,08
10	52,5 (0)	3,3 (0)	90,35	69,50	62,80
11	52,5 (0)	3,3 (0)	90,78	55,50	50,38

O rendimento é caracterizado pelo valor de porcentagem de enzima que esteve na forma livre e que de fato foi imobilizada. A eficiência avalia o quanto realmente houve de atividade ativa (observada), durante o processo de imobilização. A recuperação é outra variável importante para descrever o sucesso da imobilização, ou seja, quanto da atividade enzimática inicial ofertada ao suporte, de fato, permaneceu na forma ativa.

Foi realizado a regressão múltipla para verificar se as variáveis independentes da força iônica (X_1) e tempo (X_2) foram capazes de prever o parâmetro de rendimento, eficiência e recuperação na atividade da enzima imobilizada. Os resultados do ajuste final estão apresentados nos modelos empíricos reduzidos nas Equações 3.5, 3.6 e 3.7

$$\text{Rendimento} = 0,904 + 0,112X_1 + 0,421X_2 - 0,306X_2^2 - 0,152X_1 \cdot X_2 \quad (3.5)$$

$$\text{Eficiência} = 0,602 - 0,261X_1 + 0,023X_1^2 + 0,297X_2^2 + 0,412X_1 \cdot X_2 \quad (3.6)$$

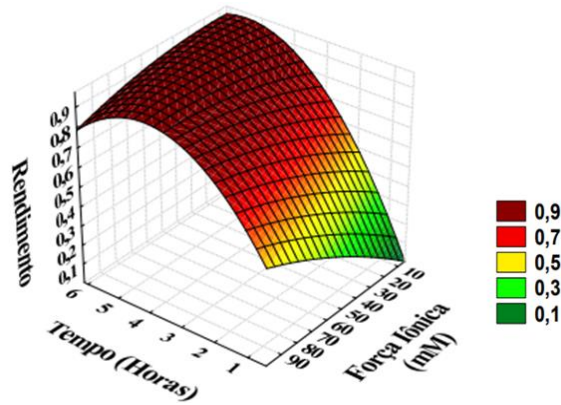
$$\text{Recuperação} = 0,572 - 0,558 X_1 + 0,270 X_2 + 0,091 X_1 \cdot X_2 \quad (3.7)$$

O coeficiente de determinação (R^2) foi de 93% para o rendimento, sugerindo que o modelo possui um bom ajuste aos dados experimentais, para a eficiência o (R^2) foi de 82%, demonstrando que a variabilidade dos dados foi explicada pela equação experimental obtida e para a recuperação o (R^2) foi de 98%, possuindo bom ajuste à reta de regressão, sendo explicada pela equação experimental.

Os efeitos apresentaram influência significativa aos modelos experimentais a 5% ($p < 0,05$) e a distribuição de resíduos se comportou de forma aleatória em torno zero sem nenhuma tendência quanto a distribuição e não se distanciaram da reta identidade, sugerindo que os modelos possuem um bom ajuste aos dados empíricos com capacidade preditiva, possuindo boa qualidade de ajuste.

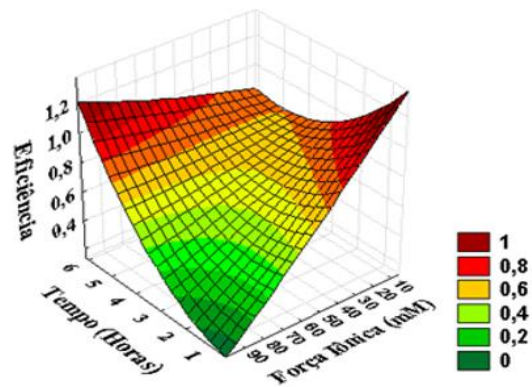
Com os modelos obtidos foi possível gerar o gráfico de superfície de resposta em relação à recuperação, eficiência e rendimento do processo de imobilização da enzima β -galactosidase de *Bacillus licheniformis* em Duolite A 568, apresentados das Figuras 3.6, 3.7 e 3.8.

Figura 3. 6 – Gráfico de superfície de resposta para os valores obtidos no parâmetro de rendimento.



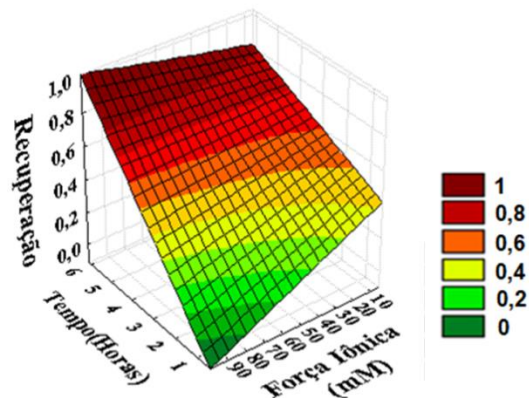
Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Figura 3. 7 – Gráfico de superfície de resposta para os valores obtidos no parâmetro de eficiência.



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Figura 3. 8 – Gráfico de superfície de resposta para os valores obtidos no parâmetro de recuperação.



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Pela análise da superfície de resposta (Figura 3.6) para o rendimento, observou-se que para qualquer concentração do tampão em maiores tempos, os resultados obtidos apresentaram maiores valores de rendimentos atingindo um “platô”.

Em relação a eficiência observou-se na Figura 3.7, que a interação entre a força iônica e o tempo de imobilização, apresentou formato de cela. Desta forma os resultados mostraram que tanto para baixas ou altas concentrações de força iônica, associadas a tempos curtos ou longos, respectivamente, implicaram em bons resultados de imobilização no que se refere a eficiência, alcançando uma faixa de 83,54% a 96,71% dos experimentos pesquisados.

Para superfície de resposta sobre a recuperação (Figura 3.8), observou-se que, tanto em baixa ou alta força iônica da concentração do tampão (5,12 a 99,8 mM), bons resultados de recuperação da atividade enzimática (superior a 80%), foram alcançados quando empregados longos tempos de imobilização (5,3h e 6,12h), demonstrando que altos níveis de recuperação podem ser obtidos utilizando desses parâmetros, obtendo bons resultados na recuperação da enzima imobilizada.

Nos resultados apresentados na Tabela 3.4 (valores das porcentagens), notou-se que, para o rendimento, os valores obtidos variaram de 19,76% (menor) a 94,15%(maior) de imobilização. Os dois menores valores alcançados foram de 19,76% e 46,45% em condições de concentração de tampão de 52,5 mM e 19 mM e em tempos de imobilização de 0,46h e 1,3h, respectivamente. Nota-se que os melhores rendimentos alcançados de 94,15%, 91,01% e 92,73% foram em condições de forças iônicas de 19 mM, 52,5 mM e 86 mM, respectivamente. Dentre esses valores, destacou-se o experimento ao qual foi realizado na condição de força iônica de 52,5 mM, pois o valor de rendimento foi elevado em 4,7 vezes quando o tempo variou de 0,46 para 6,12h, que passou de 19,76% para 91,01%, nesta mesma concentração de tampão. Os dois maiores valores de rendimento foram de 92,72% e 94,15 %, também em concentração de tampões de 52,5 mM em 12h e 19 mM, em 5,3h de contato enzima-suporte. Os resultados obtidos para as réplicas do experimento do ponto central foram próximos atingindo a média de $90,37\% \pm 0,33$.

Para a eficiência os resultados estão dispostos na Tabela 3.4 e os valores obtidos variaram de 16,15% e 96,71% nos experimentos que empregaram a mesma força iônica de 86 mM, isso ocorreu quando foi utilizado um maior tempo de imobilização. O mesmo fato ocorreu para os experimentos que foram realizados com 52,5 mM de tampão, alcançando 96,54% de eficiência quando empregado o maior tempo de imobilização em 6,12h.

Para a recuperação, de acordo com os dados obtidos na Tabela 3.4, ao uso de concentração de força iônica de 19 mM, a recuperação foi aumentada em aproximadamente 100% quando o tempo de processo de imobilização foi ampliado de 1,3h para 5,3h, que passou de 40,37% para 80%. Para a força iônica de 52,5 mM um incremento de recuperação enzimática também foi observado ao empregar tempos de imobilização de 0,46h a 6,12h, implicando em uma elevação de recuperação enzimática na ordem de 4,9 vezes, variando de 18,44% (52,5 mM em 0,46h) para 89,51% (52,5 mM em 6,12h). Em relação ao uso do tampão de 86 mM o aumento foi ainda mais expressivo, de aproximadamente 7,4 vezes maior em recuperação quando o tempo de imobilização foi ampliado de 1,3h para 5,3h culminando em uma das maiores porcentagens de recuperação (88,01%). Para estes bons resultados observa-se que foi desenvolvido um microambiente favorável para manter a capacidade catalítica da enzima e, conseqüentemente, aumentando a atividade recuperada contribuindo para uma maior atividade observada.

Para fundamentar esta pesquisa os melhores resultados em relação ao rendimento, eficiência e recuperação foram comparados com a literatura científica, conforme Tabela 3.5.

Tabela 3. 5 – Valores acima de 80% das melhores condições dos parâmetros de rendimento, eficiência e recuperação.

CONDIÇÕES	PARÂMETROS (valores > 80%)		
	Rendimento	Eficiência	Recuperação
19 mM em 5,3horas	94,15%,	84,97%	80,00%
86 mM em 5,3 horas	91,01%	96,71%	88,01%
52,5 mM em 6,12 horas	92,72%	96,54%	89,51%

Fonte: Elaborado pela autora (2022).

O maior rendimento obtido nesse trabalho corrobora com Lima et al. (2013) que investigaram a produção de β -galactosidase de *Kluyveromyces latis* imobilizada em quitosana em pó, em 50 mM de tampão de fosfato de potássio a pH 7,0 com tempo de imobilização de 5, 10 e 24h. Os pesquisadores relataram que as ligações levaram mais tempo para serem formadas, uma vez que a própria enzima se torna uma barreira para a difusão das moléculas enzimáticas havendo necessidade de um maior tempo de contato enzima-suporte. O rendimento de imobilização aumentou como maior tempo de contato que foi de 24h e o rendimento obtido foi de 99,5% muito próximo dos dados obtidos neste trabalho. Gulec

(2013) imobilizou a β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* em superfícies de membrana polimérica e foram pesquisados o efeito e as características da superfície da membrana de acetato de celulose (CA) simples e modificadas por plasma de oxigênio, por simples adsorção em tampão fosfato (0,1 M, pH 7,0). Os resultados apresentaram rendimento de imobilização de 42%, sendo esta porcentagem muito abaixo de todos os valores de rendimento obtidos nesta pesquisa, como mostrado na Tabela 3.5, em 2,24 vezes, 2,16 vezes e 2,20 vezes respectivamente.

O maior valor de eficiência da imobilização alcançado foi de 96,71% (86 mM em 5,3h), valor equiparado aos obtidos por Trusek (2019) que imobilizou a β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* em óxido de grafeno no formato de flocos ativado com divinilsulfona, por adsorção, utilizando tampão de bicarbonato 0,4 M, produzindo estabilidade alta em comparação com a enzima livre, apresentando eficiência de imobilização na faixa de 98,1–99,4%.

A recuperação refere-se à porcentagem da enzima β -galactosidase que ficou realmente imobilizada no suporte Duolite A 568 e que nesta pesquisa foi bastante expressiva em comparação a pesquisa de Sousa et al. (2021) que produziram e imobilizaram a β -galactosidase partir da levedura *Kluyveromyces marxianus*, em resina de troca iônica, Duolite A-568, avaliando conjuntamente a imobilização da enzima Lactozyme comercial. Os pesquisadores obtiveram os melhores resultados da imobilização para β -galactosidase na atividade recuperada de 19,24%, resultados que foram obtidos em pH entre 6,8 e 7,3 e concentração do tampão entre 0,1 e 0,8 M, e para a enzima comercial a imobilização recuperada foi de 12,22% em pH 6,0 de 19,47% em pH 7,0. Em confronto a 89,51% de recuperação deste trabalho, o valor foi elevado cerca de 4,7 vezes comparado a enzima produzida e imobilizada de β -galactosidase da levedura *Kluyveromyces marxianus*, e para enzima comercial Lactozyme em pH 6,0 foi ainda maior, cerca de 7,3 vezes.

A β -galactosidase também foi imobilizada em outro suporte por adsorção relatado por Ricardi et al. (2021) que desenvolveram um novo suporte híbrido de sílica mesoporoosa/titânio com um revestimento de quitosana, com o objetivo de aplicar a imobilização de β -d-galactosidase de *Kluyveromyces lactis*. No estudo a imobilização foi conduzida em tampão fosfato de potássio de 100 mM por 18 horas. Os autores aplicaram o biocatalisador em testes de atividade hidrolítica enzimática e obtiveram recuperação de atividade de 54% e eficiência de 74%. Em comparação ao resultado de recuperação deste trabalho de 89,51% (52,5 mM em 6,12 h) foi cerca de 39,7% menor, e ao valor de eficiência de 96,71% (86 mM em 5,3h) (presente pesquisa) foi de 23,48% menor.

Há extrema importância de se investigar os efeitos e as influências causadas pelos parâmetros pH, força iônica da concentração de tampões, temperaturas e tempos adequados na imobilização enzimática que neste trabalho revelou regiões ótimas de atividade enzimática dentre esses valores o de 470 U.

3.4 CONCLUSÕES

Dos resultados obtidos conclui-se que:

1. Os resultados exploratórios com condições extremas de alta molaridade de força iônica do tampão BR não implicaram em aumento da atividade enzimática imobilizada, ao contrário, indicaram inativação da enzima, visto que em alguns experimentos não foi detectada atividade enzimática na enzima livre.
2. Para os aglomerados enzimáticos formados em diferentes condições de tampão BR os resultados foram relevantes, e desta forma evidencia-se uma descoberta inovadora capaz de nortear novas pesquisas e avanços em técnicas de imobilização sem a utilização de suporte.
3. A imobilização da β -galactosidase de *Bacillus licheniformis* em suporte Duolite A 568 apresentou atividade com valores que variaram de 398 a 470 U na hidrólise da lactose, sendo os melhores resultados obtidos nas condições de imobilização que empregaram baixa concentração de tampão BR, de força iônica (19, 52,5 e 86 mM) em maiores tempos (5,3h e 6,12h), estes resultados levaram a um indicativo de haver duas regiões de condições ótimas de 470 U (86 mM e 5,3 h) e 418U (52,5 mM e 6,12h). Nos parâmetros do efeito da análise do desempenho da imobilização em observação a maior atividade da enzima de 470 U em condições de 86 mM em 5,3h uma das melhores regiões obteve-se 91,01 de rendimento, 96,71 de eficiência e 88,01 de recuperação demonstrou ser uma excelente abordagem para obter maiores e melhores resultados no aprofundamento em novas pesquisas.
4. Este trabalho demonstrou a importância de se estabelecer fatores adequados e interligados como força iônica de um tampão, pH e tempo durante o processo de imobilização, na busca por alta atividade catalítica na hidrólise da lactose, pois a interação entre desses fatores podendo ocasionar melhorias significativas na atividade do biocatalizador.

3.4.1 Sugestões para trabalhos futuros

1. Analisar a estabilidade operacional em reator contínuo da enzima β -galactosidase de *Bacillus licheniformis* imobilizada na hidrólise de lactose;
2. Avaliar influência da temperatura, pH, tempo de uso na estabilidade da enzima β -galactosidase de (*B. licheniformis*) imobilizada na hidrólise de lactose;
3. Estudar o efeito da vazão de substrato na hidrólise em reator de leito em fluxo contínuo;
4. Avaliar a hidrólise de lactose utilizando β -galactosidase de (*B.licheniformis*) imobilizada em reator de leito fixo em fluxo contínuo.

REFERÊNCIAS

ABDEL, W A.; AHMED; S. A.; KHOLIF; A. M. M; ABD EL GHANI; S.; WEHAIDY; H. R. Rice straw and orange peel wastes as cheap and eco-friendly substrates: A new approach in β -galactosidase (lactase) enzyme production by the new isolate *L. paracasei* MK852178 to produce low-lactose yogurt for lactose-intolerant people. *Waste Management*; v. 131; p. 403-411. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2021.06.028>

AHMED, S. A.; ABDELLA, M. A. A.; EL-SHERBINY, G. M.; IBRAHIM, A. M.; EL-SHAMY, A. R.; ATALLA, S. M. M.; HASSAN, M. E. Catalytic, kinetic and the rmal properties of free and immobilized *Bacillus subtilis* -MK1 α -amylase on chitosan-magnetic nanoparticles. *Biotechnology Reports*, v. 26, p. e00443. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00443>

ALBUQUERQUE, T. L.; RUEDA, N.; SANTOS, J. C. S.; BARBOSA, O.; ORTIZ, C.; BINAY, B.; ÖZDEMİR, 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>

ALBUQUERQUE, T. L.; PEIRCE, S.; RUEDA, N.; MARZOCHELLA, A.; GONÇALVES, L. R. B.; ROCHA, M. V. P.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Ion exchange of β -galactosidase: The effect of the immobilization pH on enzyme stability. *Process Biochemistry*, v. 51, n. 7, p. 875-880. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2016.03.014>

ALVES, M. D.; ARACRI, F. M.; CREN, É. C.; MENDES, A. A. Isotherm, kinetic, mechanism and thermo dynamic studies of adsorption of a microbial lipase on a mesoporous and hydrophobic resin. *Chemical Engineering Journal*, v. 311, p. 1-12. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2016.11.069>

BENJAMINS, E.; BOXEM, L.; KLEINJAN-NOEVERMAN, J.; BROEKHUIS, T. A. Assessment of repetitive batch-wisesyn the sisofgalacto-oligosac charides from lactose slurry using immobilised beta-galactosidase from *Bacillus circulans*. *International Dairy Journal*, v. 38, n. 2, p. 160-168. 2014. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2014.03.011>

BINHAYEEDING, N.; YUNU, T.; PICHID, N.; KLOMKLAO, S.; SANGKHARAK, K. Immobilisation of *Candida rugosa* Lipase on Polyhydroxy buty rate Via a Combination of Adsorption and Cross-linking Agentsto Enhance Acylglycerol Production. *Process Biochemistry*. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.02.007>

BISSWANGER, H. Enzyme assays. *Perspectives in Science*, v. 1, p. 41-55, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.pisc.2014.02.005>

BRANDANI, S. Kinetis of liquid phase batch adsorption experiments. *Adsorption*, n. 27, n. 3, p. 353-368. 2020. <https://doi.org/10.1007/s10450-020-00258-9>

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* [online], v. 37, n. 5, p. 796-803. 2014.

<https://doi.org/10.5935/0100-4042.20140128>

CAREVIĆ, M.; ČOROVIĆ, M.; MIHAILOVIĆ, M.; BANJANAC, K.; MILISAVLJEVIĆ, A.; VELIČKOVIĆ, D.; BEZBRADICA, D. Galacto-oligosaccharide synthesis using chemically modified β -galactosidase from *Aspergillus oryzae* immobilised onto macroporous amino resin. *International Dairy Journal*, v. 54, p. 50-57. 2016.

<https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2015.10.002>

CARNEIRO, L. A. B. C; YU, L.; DUPREE, P.; WARD, R. J. Characterization of a β -galactosidase from *Bacillus subtilis* with transgalactosylation activity. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 120, p. 279-287. 2018.

<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.07.116>

CHEN, N.; ZHANG, C.; LIU, Y.; DONG, X.; SUN, Y. Poly (glycidyl methacrylate) modified with cysteine grafted onto nanoparticles of silica: New supports for significantly improved lipase performance immobilized. *Biochemical Engineering Journal*, v. 147, p. 137-144, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2019.02.018>

DANTAS, A.; VERRUCK, S.; PRUDÊNCIO, E. S. Tecnologia de leite e produtos sem lactose. Atena Editora, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2021.129896>

DUCAS, J. D.; ARACRI, F. M.; MENDES, A. A. Optimization of the immobilization of a microbial lipase via physical adsorption on mesoporous hydrophobic resin. *Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016*. 2016.

ESLAMIPOUR, F.; HEJAZI, P. Effects of surface modification and activation of magnetic nanoparticles on the formation of amylase immobilization bonds under different ionic strength conditions. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v.119, p. 1-11. 2015.

<https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2015.05.006>

FRAAS, R.; FRANZREB, M. Reversible covalent enzyme immobilization methods for reuse of carriers. *Biocatalysis and Biotransformation*, v. 35, n.5, p. 337-348. 2017.

<https://doi.org/10.1080/10242422.2017.1344229>

GAN, J. S.; BAGHERI, A. R.; ARAMESH, N.; GUL, I.; FRANCO, M.; LMULAIKY, Y. Q.; BILAL, M. Covalent organic structures as emerging host platforms for benzylamine immobilization and robust biocatalysis - a review. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 167, p. 502-515, 2021.

<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.12.002>

GENNARI, A.; SIMON, R.; ANDRADE, B. C.; TIMMERS, L. F. S M.; MARTINS, V. L. M.; RENARD, G.; SOUZA, C. F. V. Production of beta-galactosidase fused to a cellulose-binding domain for application in sustainable industrial processes. *Bioresource Technology*,

v. 326, p. 124747. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.124747>

GOMES, T. A. β -galactosidase de origem microbiana: produção, otimização, escalonamento e caracterização. Tese - Universidade Federal do Paraná, (Doutorado em Engenharia de Alimentos, no Curso de Doutorado em Engenharia de Alimentos, Setor de Tecnologia, 2018.

GOMES, T. A.; SANTOS, L. B.; NOGUEIRA, A.; SPIER, M. R. Increase in an intracellular β -galactosidase biosynthesis using *L. reuteri* B-14171, inducers and alternative low-cost nitrogen sources under submerged cultivation. International Journal of Food Engineering, v. 14, n. 3, p. 1-12. 2018. <https://doi.org/10.1515/ijfe-2017-0333>

GONÇALVES, L. R. B.; FERREIRA, A. L. O.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GUIBAN, J. M.; GIORDANO, R. C.; GIORDANO, R. L. C. Influence of mass transfer limitation on the enzymatic synthesis of β -lactam antibiotics catalyzed by penicillin G acylase immobilized on glioxil-agarose. Bioprocess and Biosystems Engineering, v. 31, n. 5, p. 411-418. 2007. DOI:10.1007/s00449-007-0176-2. <https://doi.org/10.1007/s00449-007-0176-2>

GUERRERO, C.; VERA, C.; CONEJEROS, R.; ILLANES, A. Transgalactosylation and hydrolytic activities of commercial preparations of β -galactosidase for the synthesis of prebiotic carbohydrates. Enzyme and Microbial Technology, v. 70, p. 9-17. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2014.12.006>

GÜLEÇ, H. A. Immobilization of β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* onto polymeric membrane surfaces: Effect of surface characteristics. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, v. 104, p. 83-90. 2013. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.11.039>

HOARAU, M.; BADIEYAN, S.; MARSH, E. N. G. Immobilized enzymes: understanding enzyme - surface interaction at the molecular level. Organic Biomolecular Chemistry, v. 15, n.45, p. 9539-9551. 2017. <https://doi.org/10.1039/C7OB01880K>

ICHI-RIBAULT, E. S.; ZEBDA, A.; TINGRY, S.; PETIT, M.; SUHERMAN, A. L., BOUALAM, A.; MARTIN, D. K. Performance and stability of chitosan-MWNTCs-laccase biocathode: Effect of MWNTCs surface charges and ionic strength. Journal of Electroanalytical Chemistry, v. 799, p. 26-33. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2017.05.018>

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

JOCHEMS, P.; SATYAWALI, Y.; VAN ROY, S.; DOYEN, W.; DIELS, L.; DEJONGHE, W. Characterization and optimization of β -galactosidase immobilization process on a mixed matrix membrane. Enzyme and microbial technology, v.49, n. 6, p. 580-588. 2011. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2011.06.010>

KUJAWA, J.; GŁODEK, M.; LI, G.; AL-GHARABLI, S.; KNOZOWSKA, K.; KUJAWSKI, W. Highly effective enzymes immobilization on ceramics: Requirements for

supports and enzymes. *Science of The Total Environment*, v. 801, p. 149647. 2021.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.149647>

LAI, E.; WANG, Y.; WEI, Y.; LI, G.; MA, G. Covalent immobilization of trypsin on to thermo-sensitive poly (N-isopropylacrylamide-co-acrylic acid) microspheres with high activity and stability. *Journal of Applied Polymer Science*, v.133, n.21, p.43343. 2016.
<https://doi.org/10.1002/app.43343>

LEE, C. H.; LEE, H. S.; LEE, J.W.; KIM, J.; LEE, J. H.; JIN, E. S.; HWANG, E.T. Evaluating enzyme stabilizations in calcium carbonate: Comparing in situ and crosslinking mediated immobilization. *International Journal of Biological Macromolecules*, v.175, p. 341-350, 2021.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.02.028>

LEE, J. H.; KIM, S. B.; PARK, C.; KIM, S. W. Effect of a buffer mixture system on the activity of lipases during immobilization process. *Bioresource Technology*, v. 101, n. 1, p. S66-S70.2010. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.03.031>

LEITE, A. C. S.; CORTES, N. M. S; CORTEZ, N.M. S.; ALBUQUERQUE, S. S. M. C.; SHINOHARA, N. K. S.; MACEDO, I. M. E.; ANDRADE, S. A. C. Production of beta-galactosidase fused to a cellulose-binding domain for application in sustainable industrial processes. *Bioresource Technology*, v. 326, p. 124747, 2021.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.124747>

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>

LIU, D.-M.; CHEN, J.; SHI, Y.-P. Advances on methods and easy separated support materials for enzymes immobilization. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, v.102, p. 332-342. 2018.
<https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.03.011>

LIU, G.; SUN, L.; WU, X.; ZHANG, W.; FENG, J.; CUI, Y.; YUAN, S. Immobilization of puerarin glycosidase from Micro bacterium oxydans CGMCC 1788 increases puerarin transformation efficiency. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v. 31, n. 2, p. 325-333. 2014.
<https://doi.org/10.1590/0104-6632.20140312s00002768>

LUNDIN, M.; ELOFSSON, U. M.; BLOMBERG, E.; RUTLAND, M. W. Adsorption of lysozyme, β -casein and their layer-by-layer formation on hydrophilic surfaces: Effect of ionic strength. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 77, n.1, p. 1-11. 2010.
<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2009.12.019>

MANOEL, E. A.; SANTOS, J. C. S.; FREIRE, D. M. G.; RUEDA, N.; FERNANDEZ-

LAFUENTE, R. Immobilization of lipases on hydrophobic supports involves the open form of the enzyme. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 71, p. 53-57, 2015.

<https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2015.02.001>

NAZIR, A.; MAAN, A. A.; SHAUKAT, M. N. Potential applications of industrial by-products of food in the dairy industry. *Recovery of food waste (second edition)*, p. 445-460, 2021.

<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-820563-1.00009-3>

PAIVA, V. N.; GOMES, E. R.; SANTOS, V. M.; STEPHANI, R.; CARVALHO, A. F.; PERRONE, I. T. Desafios tecnológicos na produção de produtos com baixo teor de lactose. *Rev. Inst. Laticínios Cândido Tostes*, v. 73, n. 2, p. 91-101, 2018.

<https://doi.org/10.14295/2238-6416.v73i2.665>

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>

PORTNOY, M.; BARBANO, D. M. Lactose: use, measurement and expression of results.

Journal of Dairy Science, v.104, p. 8314-8325, 2021. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-18706>

PRIMOŽIČ, M.; KRAVANJA, G.; KNEZ, Ž.; CRNJAC, A.; LEITGEB, M. Immobilized lacase in the form of (magnetic) cross-linked enzyme aggregates for sustainable diclofenac (bio) degradation. *Journal of Cleaner Production*, v. 124121.2020.

<https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.124121>

RABA, J.; MOTTOLA, H. A. Glucose oxidase as an analytical reagent. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, v. 25, n. 1, p. 1-42, 1995.

<https://doi.org/10.1080/10408349508050556>

RAVEENDRAN, S.; PARAMESWARAN, B.; UMMALYMA, S. B.; ABRAHAM, A.; MATHEW, A. K.; MADHAVAN, A.; REBELLO, S.; PANDEY, A. Applications of Microbial in Food Industry. *Food Technol. Biotechnol.*, v. 56, n. 1, p. 16-30, 2018.

<https://doi.org/10.17113/ftb.56.01.18.5491>

RIBEIRO, E. S.; DE FARIAS, B. S.; SANT'ANNA CADAVAL JUNIOR, T. R., DE ALMEIDA PINTO, L. A.; DIAZ, P. S. Chitosan-based nanofibers for enzyme immobilization. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 183, p. 1959-1970, 2021.

<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.05.214>

RICARDI, N. C.; ARENAS, L. T.; BENVENUTTI, E. V.; HINRICHS, R.; FLORES, E.; HERTZ, P. F., COSTA, T. M. H. High performance biocatalyst based on β -d-galactosidase immobilized on mesoporous silica/titania/chitosan material. *Food Chemistry*, v. 359, p. 129890.2021.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129890>

SEN, P.; NATH, A.; BHATTACHARJEE, C.; CHOWDHURY, R.; BHATTACHARYA, P. Process engineering studies of free and micro-encapsulated β -galactosidase in batch and packed bed bioreactors for production of galactooligosaccharides. *Biochemical Engineering*

Journal, v. 90, p. 59-72. 2014. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2014.05.006>

SHARMA, A.; THATAI, K. S.; KUTHIALA, T.; SINGH, G.; ARYA, S. K. Employment of polysaccharides in enzyme immobilization. *Reactive and Functional Polymers*, v. 167, p. 105005. 2021.

<https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2021.105005>

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>

SIGURDARDÓTTIR, S. B.; LEHMANN, J.; OVTAR, S.; GRIVEL, J.-C., NEGRA, M. D., KAISER, A., PINELO, M. Enzyme Immobilization on Inorganic Surfaces for Membrane Reactor Applications: Mass Transfer Challenges, Enzyme Leakage and Reuse of Materials. *Advanced Synthesis & Catalysis*, v. 360, n. 14, p. 2578-2607. 2018.

<https://doi.org/10.1002/adsc.201800307>

SILVA, A.; RESENDE, R. J.; COSTA, T. C.; SOUSA, B. V. O.; SANTOS, A. K.; MAROTTI, B. S.; SILVA, S. L.; CANCELIER, A.; GONÇALVES, D. B. Análise do potencial biocatalítico de lipase de *Candida rugosa* imobilizada em diferentes suportes. *Acta Ambiental Catarinense*, v. 18, p. 01. 2021. <https://doi.org/10.24021/raac.v18i1.5505>

SILVA, L. C. C.; SOUSA, C. C.; FALLEIROS, L. N. S. S. Imobilização de β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* em resina de troca iônica e reticulação com glutaraldeído. Congresso Brasileiro de engenharia química em Iniciação Científica, 2019.

<https://doi.org/10.5151/cobecic2019-PBIO23>

SILVÉRIO, S. C.; MACEDO, E. A.; TEIXEIRA, J. AL.; RODRIGUES, L. R. New β -galactosidase producers with potential for prebioticsynthesis. *Bioresource Technology*, v. 250, p. 131-139 2018. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.11.045>

SOARES, T. L. D.; KELLY, K. F. S.; BARBOSA, I. R.; SOUSA, F. C. A.; SOUZA, E. F.; AZEVEDO, T. L.; SANTOS, A. A.; GOTTSCHALK, L. M. F.; STEPHAN, M. P.; SILVA, C. M.; BRÍGIDA, A. I. S. Imobilização de lipase de *Aspergillus niger* por adsorção. XX Congresso de Engenharia Química, 2014.

SOUSA, C. C.; RESENDE, M. M.; FALLEIROS, L. N. S. S.; RIBEIRO, E. J. Synthesis and Immobilization of β -galactosidase from *Kluyveromyces marxianus* using ion exchange resin. *Industrial Biotechnology*, v. 17, n. 1. 2021.

<https://doi.org/10.1089/ind.2020.0007>

TIZCHANG, S.; KHIABANI, M. S.; MOKARRAM, R. R.; HAMISHEHKAR, H.; MOHAMMADI, N. S.; CHISTI, Y. Immobilization of β -galactosidase by *halloysite*-adsorption and entrapment in a cellulose nanocrystals matrix. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, v. 1865, n. 6, p.129896. 2021.

<https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2021.129896>

TRUSCOTT, S. M. Laboratory calculations. *Contemporary Practice in Clinical Chemistry*, p. 97-117.2020. DOI:10.1016/b978-0-12-815499-1.0

<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815499-1.00006-5>

VAZQUEZ-ORTEGA, P. G.; ALCARAZ-FRUCTUOSO, M. T.; ROJAS-CONTRERAS, J. A.; LÓPEZ-MIRANDA, J.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Stabilization of dimeric β -glucosidase from *Aspergillus niger* via glutaraldehyde immobilization under different conditions. *Enzyme and Microbial Technology*, 110, 38-45. 2018.

<https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2017.12.007>

GENNARI, A.; SIMON, R.; ANDRADE, B. C.; TIMMERS, L. F. S M.; MARTINS, V. L. M.; RENARD, G.; SOUZA, C. F. V. Production of beta-galactosidase fused to a cellulose-binding domain for application in sustainable industrial processes. *Bioresource Technology*, v. 326, p. 124747. 2021.

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.124747>

KURIBAYASHI, L. M.; RIBEIRO, V. P. R.; SANTANA, R. C.; RIBEIRO, E. J.; SANTOS, M. G.; FALLEIROS, L. N. S. S.; GUIDINI, C. Z. Immobilization of β -galactosidase from *Bacillus licheniformis* for application in the dairy industry. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.105, n. 9, p. 3601-3610. 2021. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11325-8>

VERA, C.; ILLANES, A. *Lactose Derived Prebiotics. A Process Perspective*, First Edit, Elsevier, New York, p. 87-110. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802724-0.00003-2>.

VERA, C.; GUERRERO, C.; CORDOVA, A.; ILLANES, A. Conventional and non-conventional applications of β -galactosidases. *Biochemical Biophysical Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, v. 1868, p.140271, 2020.

<https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2019.140271>

XU, M.; JI, D.; DENG, Y.; AGYEI, D. Preparation and assessment of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) of β -galactosidase from *Lactobacillus leichmannii* 313. *Food and Bioprocess Processing*, v. 124, p. 82-96.2020. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2020.08.004>

WANG, M.; HUA, X.; YANG, R.; SHEN, Q. Immobilization of cellobiose 2-epimerase from *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* on commercial resin Duolite A 568. *Food Bioscience*, v. 14, p. 47-53, 2016.

<https://doi.org/10.1016/j.fbio.2016.03.001>

WANG, L.-L.; FAN, M.; XING, X.; LIU, Y.; SUN, S. Immobilization of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase on Fe₃O₄ magnetic nanoparticles and its application in histamine removal. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 205, p. 111917. 2021.

<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2021.111917>

WOLF, M.; GASPARIN, B. C.; PAULINO, A. T. Hydrolysis of lactose using β -D-galactosidase immobilized in a modified Arabic gum-based hydrogel for the production of lactose-free/low-lactose milk. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 115,

p. 157-164, 2018.

<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.04.058>

YANG, J.; RAINVILLE, P.; LIU, K.; POINTER, B. Determination of lactose in low-lactose and lactose-free dairy products using LC-MS. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 100, p. 103824, 2021.

<https://doi.org/10.1016/j.jfca.2021.103824>

ZAHIRINEJAD, S.; HEMMATI, R.; HOMA EI, A.; DINARI, A.; HOSSEINKHANI, S.; MOHAMMADI, S.; VIANELLO, F. Nano-organic supports for enzyme immobilization: Scopes and perspectives. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 204, p. 111774. 2021.

<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2021.111774>

ZEUNER, B.; MA, N.; BERENDT, K.; MEYER, A. S.; ANDRIC, P.; JØRGENSEN, J. H.; PINELO, M. Immobilization of alcoholde hydrogenase on ceramic silicon carbide membranes for enzymatic CH₃OH production. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. 2018. <https://doi.org/10.1002/jctb.5653>