



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
UBERLÂNDIA**



Faculdade de Engenharia Química  
Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos

---

**ADRIELLE APARECIDA PAULISTA RIBEIRO**

**Patos de Minas - MG**

**2023**

**ADRIELLE APARECIDA PAULISTA RIBEIRO**

**Microencapsulação em spray dryer de células de *Kluyveromyces marxianus* que expressam atividade de  $\beta$ -galactosidase**

Defesa 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.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Marta Fernanda Zotarelli

Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Carla Zanella Guidini

Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Larissa Nayhara Soares Santana Falleiros

**Patos de Minas - MG**

**2023**

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

R484  
2023

Ribeiro, Adrielle Aparecida Paulista, 1995-  
Microencapsulação em spray dryer de células de  
Kluyveromyces marxianus que expressam atividade de beta-  
galactosidase [recurso eletrônico] / Adrielle Aparecida  
Paulista Ribeiro. - 2023.

Orientadora: Marta Fernanda Zotarelli.

Coorientadora: 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.2023.54>

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

1. Alimentos - Indústria. I. Zotarelli, Marta Fernanda  
,1985-, (Orient.). II. Guidini, Carla Zanella ,1983-,  
(Coorient.). III. Falleiros, Larissa Nayhara Soares  
Santana ,1988-, (Coorient.). IV. Universidade Federal  
de Uberlândia. Pós-graduação em Engenharia de Alimentos.  
V. Título.

CDU: 664

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:

Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091

Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Engenharia de Alimentos				
Defesa de:	Dissertação de Mestrado Acadêmico n. 3/2023 - PPGEA				
Data:	Dez de fevereiro de dois mil e vinte e três	Hora de início:	14:00	Hora de encerramento:	16:55
Matrícula do Discente:	42112EAL001				
Nome do Discente:	Adrielle Aparecida Paulista Ribeiro				
Título do Trabalho:	Microencapsulação em <i>spray-dryer</i> de células de <i>Kluyveromyces marxianus</i> que expressam atividade de $\beta$ -galactosidase				
Área de concentração:	Engenharia de Alimentos				
Linha de pesquisa:	Processos Biotecnológicos				

Reúne-se por webconferência (Teams) a Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos, assim composta: Carla Zanella Guidini (Presidente/Coorientadora), Franciny Campos Schmidt (Membro Externo) e Yanne Novais Kyriakidis (Membro UFU).

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 reservada, 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 10/02/2023, às 16:54, 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 **Franciny Campos Schmidt, Usuário Externo**, em 10/02/2023, às 16:55, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Yanne Novais Kyriakidis, Professor(a) do Magistério Superior**, em 10/02/2023, às 16:55, 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](https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **4225239** e o código CRC **47442B77**.

Dedico esta dissertação primeiramente a Deus, pois todo o meu viver é teu, aos meus pais Benedito e Anália, aos meus irmãos Angélica e Carlos Eduardo e ao meu esposo Rodrigo; pela compreensão durante essa e todas as outras caminhadas.

Ao Senhor tudo dai graças...

## AGRADECIMENTOS

A realização deste projeto de pesquisa só foi possível porque Deus trilhou o meu caminho e devido ao apoio recebido de várias pessoas que de alguma forma contribuíram direta ou indiretamente e, no qual, sou muito grata a todos.

Aos meus pais, esposo e a minha vizinha que nunca me deixaram desistir, sempre tornaram os momentos difíceis mais brandos e sempre acreditaram no meu potencial;

Aos meus irmãos e em especial a minha irmã que sempre me incentivou a trilhar o caminho acadêmico;

Aos meus colegas de trabalho, que sempre contribuíram com a minha busca pelo conhecimento;

Aos meus Professores e professoras, em especial a Dra Marta, Dra Larissa, Dra. Carla Zanella e Dra Carla Sousa que me acompanharam de perto nessa árdua caminhada contribuindo vigorosamente na elaboração deste trabalho;

Aos técnicos do Laboratório e todos os funcionários do laboratório que de alguma forma sempre colaboraram com o desenvolvimento da pesquisa;

As empresas que contribuíram doando materiais para que a pesquisa pudesse ser realizada, Lactosul Indústria de Laticínios LTDA, Suinco – Cooperativa de Suinocultores LTDA;

E por fim aos meus amigos que sempre me arrancaram sorrisos e estiveram sempre ao meu lado.

*“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.*

*Marthin Luther King*

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	i
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	iii
<b>LISTA DE QUADROS</b> .....	iv
<b>LISTA DE SÍMBOLOS</b> .....	v
<b>RESUMO</b> .....	vi
<b>ABSTRACT</b> .....	vii
Capítulo 1 - INTRODUÇÃO .....	8
1.1 OBJETIVOS.....	9
1.2 ESTRUTURA DO TRABALHO .....	9
Capítulo 2 - REVISÃO DA LITERATURA: .....	10
2.1 INTRODUÇÃO .....	10
2.2 ENZIMAS INDUSTRIAIS.....	11
2.2.1 Enzima $\beta$ -galactosidase e seu mecanismo de ação .....	12
2.2.1.1 Fontes.....	14
2.3 $\beta$ -GALACTOSIDASE APLICADA A PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS .....	16
2.3.1 Pessoas intolerantes à lactose .....	18
2.3.2 Galacto-oligossacarídeos (GOS).....	19
2.4 MÉTODOS DE IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA.....	19
2.4.1 Métodos físicos .....	22
2.4.1.1 Adsorção .....	22
2.4.1.2 Encapsulamento.....	22
2.4.2 Métodos químicos .....	23
2.4.2.1 Ligação covalente.....	23
2.4.2.2 Reticulação.....	24

2.5	MICROENCAPSULAÇÃO DA ENZIMA B-GALACTOSIDASE E DE CÉLULAS QUE EXPRESSAM ATIVIDADE ENZIMÁTICA .....	25
2.5.1	Secagem por atomização .....	27
2.5.2	Liofilização.....	29
2.5.3	Emulsificação com evaporação de solvente .....	30
2.6	BIOPOLÍMEROS PARA MICROENCAPSULAÇÃO.....	31
2.6.1	Amido.....	32
2.6.2	Maltodextrina .....	33
2.6.3	Quitosana .....	33
2.6.4	Goma Arábica.....	34
2.6.5	Alginato .....	34
2.6.6	Interação entre polímeros e outros compostos .....	35
2.7	ESTABILIDADE DA $\beta$ -GALACTOSIDASE imobilizada .....	41
2.8	REFERÊNCIAS.....	44
	Capítulo 3 - EFEITO DE DIFERENTES MATERIAIS DE PAREDE NA FORMAÇÃO DE MICROPARTÍCULAS DE CÉLULAS DE <i>KLUYVEROMYCES MARXIANUS</i> QUE EXPRESSAM ATIVIDADE DE $\beta$ -GALACTOSIDASE .....	60
3.1	INTRODUÇÃO .....	60
3.2	MATERIAL E MÉTODOS .....	62
3.2.1	Material.....	62
3.2.2	Metodologia.....	63
3.2.2.1	Produção da levedura <i>K. marxianus</i> que expressa atividade da enzima $\beta$ -galactosidase e determinação da concentração celular .....	63
3.2.2.2	Solução de alimentação do spray dryer.....	65
3.2.2.3	Microencapsulação das células de <i>K. marxianus</i> .....	66

3.2.2.4	Caracterização e avaliação do rendimento de secagem das micropartículas obtidas com diferentes materiais de parede .....	67
3.2.2.5	Avaliação microestrutural das micropartículas .....	69
3.2.2.6	Avaliação por espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier com reflexão atenuada (FTIR-ATR) .....	69
3.2.2.7	Determinação da atividade enzimática da $\beta$ -galactosidase presente na célula de <i>K. marxianus</i> livre e microencapsulada.....	69
3.2.2.8	Estudo da estabilidade ao armazenamento .....	71
3.2.2.9	Estudo da estabilidade térmica .....	71
3.2.2.10	Estudo da estabilidade ao pH .....	72
3.2.2.11	Análise de dados .....	73
3.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	73
3.3.1	Produção da levedura <i>K. marxianus</i> que expressa atividade da enzima $\beta$ -galactosidase	73
3.3.2	Caracterização e avaliação do rendimento de secagem das micropartículas obtidas com diferentes materiais de parede .....	74
3.3.3	Avaliação microestrutural das células de <i>K. marxianus</i> microencapsulada e dos materiais de parede por microscopia eletrônica de varredura.....	77
3.3.4	Avaliação por espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier com reflexão total atenuada (FTIR-ATR) da microestrutura da célula de <i>K. marxianus</i> revestida com diferentes materiais de parede .....	81
3.3.5	Determinação da atividade enzimática da $\beta$ -galactosidase presente na célula de <i>K. marxianus</i> livre e microencapsulada .....	86
3.3.6	Estudo da estabilidade ao armazenamento da célula de <i>K. marxianus</i> microencapsulada que expressa atividade de $\beta$ -galactosidase .....	87
3.3.7	Estudo da estabilidade térmica da célula de <i>K. marxianus</i> microencapsulada que expressa atividade de $\beta$ -galactosidase .....	90

3.3.8 Estudo da estabilidade ao pH da célula de <i>K. marxianus</i> microencapsulada que expressa atividade de $\beta$ -galactosidase.....	97
3.4 CONCLUSÕES .....	98
3.5 REFERÊNCIAS.....	100
<b>PROPOSTAS PARA TRABALHOS FUTUROS .....</b>	<b>105</b>
<b>ANEXO A .....</b>	<b>106</b>
<b>ANEXO B .....</b>	<b>107</b>
<b>APÊNDICE A .....</b>	<b>108</b>
<b>APÊNDICE B .....</b>	<b>109</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 - Mecanismo simplificado para síntese de GOS e hidrólise da lactose. ....	13
Figura 2.2 - Mecanismo simplificado para síntese de lactulose.....	14
Figura 2.3 - Aplicações de $\beta$ -galactosidase microbiana.....	17
Figura 2.4 - Métodos de imobilização enzimática.....	21
Figura 2.5 - Morfologia das micropartículas: microcápsula e microesfera. ....	26
Figura 2.6 - Atomização em <i>Spray dryer</i> .....	28
Figura 2.7 - Esquema da operação de um liofilizador. ....	29
Figura 2.8 - Produção de micropartículas pelo método de emulsificação/evaporação de solvente. ....	31
Figura 3.1 - Fluxograma do desenvolvimento da metodologia experimental. ....	62
Figura 3.2 - Esquema do processo de fermentação. ....	65
Figura 3.3 - Esquema de microencapsulação da célula <i>K. marxianus</i> . ....	66
Figura 3.4 - Esquema para a determinação da atividade enzimática.....	70
Figura 3.5 - Perfil de concentração de biomassa durante a fermentação da <i>K. marxianus</i> . ....	73
Figura 3.6 - Imagem MEV da célula <i>K. marxianus</i> seca em spray dryer sem material de parede.....	78
Figura 3.7 - Imagens MEV dos materiais de parede e das micropartículas de célula de <i>K. marxianus</i> que expressam atividade da $\beta$ -galactosidase com diferentes biopolímeros: alginato de sódio, maltodextrina, goma arábica e proteína de soja isolada. ....	79
Figura 3.8 - FTIR – ATR da célula, goma arábica e célula com goma arábica.....	81
Figura 3.9 - FTIR – ATR da célula, PIS e célula com PIS.....	83
Figura 3.10 - FTIR – ATR da célula, maltodextrina (MD) e célula com MD.....	84
Figura 3.11 - FTIR – ATR da célula, alginato de sódio e célula com alginato.....	85
Figura 3.12 - Estabilidade ao armazenamento da $\beta$ -galactosidase microencapsulada armazenada à 4°C e 25°C, utilizando diferentes materiais de parede com o mesmo núcleo: a) alginato de sódio; b) maltodextrina; c) goma arábica, d) proteína isolada de soja e e) célula sem material de parede.....	88

Figura 3.13- Perfis de inativação térmica a 30 °C (a), 35 °C (b), 40 °C (c) e 50° C (d) em pH 7,0 para $\beta$ -galactosidase presente na célula de <i>K. marxianus</i> imobilizada com maltodextrina, PIS e sem material de parede. ....	90
Figura 3.14 - Ajuste do modelo de Arrhenius aos dados experimentais (valores de $k_d$ ) para micropartículas de células com maltodextrina. ....	94
Figura 3.15 - Ajuste do modelo de Arrhenius aos dados experimentais (valores de $k_d$ ) para micropartículas de células com proteína isolada de soja .....	95
Figura 3.16 - Ajuste do modelo de Arrhenius aos dados experimentais (valores de $k_d$ ) para micropartículas de células sem material de parede. ....	96
Figura 3.17 - Influência do pH na estabilidade da $\beta$ -galactosidase em tampão fosfato de potássio-hidróxido de sódio em diferentes valores de pH 6,0; 6,5; 7,0; 7,3; 7,5 e 8,0 a 30 °C. ....	97

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 3.1 - Parâmetros físico-químicos dos polímeros.....	74
Tabela 3.2 - Parâmetros físico-químicos das micropartículas e rendimentos de secagem.....	75
Tabela 3.3 - Manutenção da atividade de $\beta$ -galactosidase após a microencapsulação. .....	86
Tabela 3.4 – Parâmetros de ajustes do modelo de desativação térmica de primeira ordem aos dados experimentais para $\beta$ -galactosidase presente na célula de <i>K. marxianus</i> imobilizada com diferentes materias de parede (maltodextrina, PIS) e sem material de parede. .....	92
Tabela 3.5 - Valores de $k_d$ e tempos de meia-vida calculados pelo modelo de primeira ordem .....	93

## LISTA DE QUADROS

Quadro 2.1 - Versatilidade de utilização de enzimas que se estendem aos mais variados tipos de indústrias. ....	11
Quadro 2.2 - Diferentes fontes de $\beta$ -galactosidase estudadas. ....	15
Quadro 2.3 - Métodos de microencapsulação. ....	25
Quadro 2.4 - Materiais de parede utilizados na microencapsulação de alimentos. ....	32
Quadro 2.5 - Estudos de microencapsulação de $\beta$ -galactosidase com diferentes polímeros como materiais de parede. ....	37

## LISTA DE SÍMBOLOS

A	Atividade enzimática
A/A <sub>0</sub>	Atividade enzimática em relação à inicial
A <sub>0</sub>	Atividade enzimática inicial
β	Beta - forma anomérica da enzima β-galactosidase
R <sup>2</sup>	Coefficiente de correlação
k <sub>d</sub>	Constante cinética de desativação térmica
α <sub>1</sub>	E <sub>1</sub> /E Razão entre a atividade específica do estado final (E <sub>1</sub> ) para uma modelagem de inativação com uma única etapa e a atividade inicial (E)
E <sub>a</sub>	Energia de ativação do processo de desativação térmica da enzima
A*	Fator de frequência para a reação
GOS	Galacto-oligossacarídeos
GRAS	Geralmente reconhecido como seguro
GH	Glicosídeo Hidrolase
MD	Maltodextrina
M <sub>s</sub>	Matéria seca
K <sub>m</sub>	Medida da afinidade da enzima pelo substrato
P	Nível de significância
PIS	Proteína Isolada de Soja
$\sum (v - \bar{v})^2$	Somatória dos quadrados dos desvios das observações (v) em relação ao modelo ( $\bar{v}$ )
t	t de student
T	Temperatura absoluta (K)
t <sub>1/2</sub>	Tempo de meia-vida
U	Unidade da atividade enzimática (μmol de glicose por minuto)

## RESUMO

A  $\beta$ -galactosidase é uma enzima de grande importância comercial que tem sido utilizada na indústria, devido sua grande aplicabilidade. Pesquisadores buscam uma forma adequada para seu uso industrial, deste modo, realiza-se a imobilização da  $\beta$ -galactosidase que favorece o manuseio e utilização, bem como seu reaproveitamento. Existem diferentes métodos para realizar a imobilização e os mais usados são adsorção, encapsulamento e reticulação. A microencapsulação é um método de encapsulamento que consiste na formação de uma microcápsula protegendo o agente de interesse. Esse método pode contribuir para aumentar a estabilidade morfológica, reduzir a desnaturação enzimática, melhorar a permeabilidade físico-química e a biocompatibilidade enzimática. Considerando o exposto, o objetivo desse estudo foi imobilizar por microencapsulação as células de *K. marxianus* que expressam atividade enzimática da  $\beta$ -galactosidase, utilizando como materiais de parede para a formação da micropartícula alginato de sódio, maltodextrina DE10, goma arábica e proteína isolada de soja com concentração de 2%. A microencapsulação aconteceu por meio de secagem em *spray dryer*. Os parâmetros de secagem utilizados foram: temperatura de ar de secagem 90 °C; vazão do ar de atomização 40 L/min; fluxo de entrada de ar de secagem 1,65 m<sup>3</sup>/min; fluxo da solução de alimentação igual a 0,600 L/h. Dentre os materiais de parede utilizados, a maltodextrina DE10 e a proteína isolada de soja (PIS) apresentaram-se como os melhores para as micropartículas formadas, pois preservaram a atividade catalítica durante a estocagem sob refrigeração em 87,5% e 91,9% e a temperatura ambiente em 83,0% e 75,0% respectivamente, ambos apresentaram baixa umidade (4,38% e 3,49%) e atividade de água (0,40 e 0,37), além da conservação da atividade enzimática (20% e 25%) após o processo de imobilização. A célula sem revestimento apresentou bons resultados, sendo capaz de manter 20% da sua atividade após a secagem em *spray dryer*, além disso apresentou o maior rendimento de secagem (60,5%). O resultado deste estudo mostrou que o processo de microencapsulação pode ser considerado uma alternativa viável ao uso da enzima  $\beta$ -galactosidase em sua forma extracelular líquida pois a imobilização da célula de *K. marxianus* foi capaz de manter a atividade da enzima. Além disso, verificou-se a possibilidade de utilizar a enzima sem a necessidade do processo de purificação, impactando no custo de produção.

**Palavras chave:** encapsulação; biopolímeros, imobilização; lactase, material de parede.

## ABSTRACT

The  $\beta$ -galactosidase is an enzyme of significant commercial importance and has found widespread applications in the industry due to its versatility. Researchers are actively seeking suitable methods for its industrial utilization, leading to the immobilization of  $\beta$ -galactosidase to enhance handling, utilization, and recyclability. Various immobilization methods exist, with adsorption, encapsulation, and cross-linking being the most commonly employed. Microencapsulation, a specific encapsulation method, involves the formation of microcapsules to protect the target agent. This method has the potential to enhance morphological stability, reduce enzymatic denaturation, improve physical-chemical permeability, and enhance enzymatic biocompatibility. In light of the above, the primary objective of this study was to immobilize  $\beta$ -galactosidase enzymatic activity in *K. marxianus* cells through microencapsulation. The selected wall materials for microparticle formation were sodium alginate, maltodextrin DE10, gum arabic, and isolated soy protein, each at a concentration of 2%. Microencapsulation was achieved through spray drying, employing the following drying parameters: drying air temperature of 90 °C, atomization air flow rate of 40 L/min, drying air inlet flow of 1.65 m<sup>3</sup>/min, and a feeding solution flow rate of 0.600 L/h. Among the chosen wall materials, maltodextrin DE10 and isolated soy protein (ISP) demonstrated superior performance in preserving catalytic activity during refrigerated storage (87.5% and 91.9%) and at room temperature (83.0% and 75.0%), exhibiting low moisture content (4.38% and 3.49%) and water activity (0.40 and 0.37). Furthermore, these materials maintained enzymatic activity (20% and 25%) post-immobilization. The uncoated cell also yielded promising results, retaining 20% of its activity after spray drying and achieving the highest drying efficiency (60.5%). This study underscores the viability of microencapsulation as an alternative to utilizing  $\beta$ -galactosidase in its liquid extracellular form. The immobilization of *K. marxianus* cells proved effective in maintaining enzymatic activity, and the possibility of using the enzyme without purification suggests potential cost savings in the production process.

**Keywords:** encapsulation; biopolymers, immobilization; lactase, wall material.

## CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO

Cerca de 70% da população adulta sofre atualmente de intolerância à lactose, pessoas que perderam a capacidade de hidrolisar a lactose, apresentando sintomas clínicos após o consumo de leite e seus derivados (DEWIASTY et al., 2021; FACIONI et al., 2020; KANTH et al., 2019; WILEY, 2020). Após a hidrólise da lactose, a glicose é utilizada principalmente para produção de energia; entretanto, a galactose é utilizada pelos recém-nascidos para diversos propósitos como produção de energia; comunicações célula-célula, funções imunológicas, estabilização de células epiteliais e desenvolvimento neurológico (FOGLIANO et al., 2020; SZILAGYI; ISHAYEK, 2018; TREISTER-GOLTZMAN; FRIGER; PELEG, 2018).

Devido à grande parte da população mundial apresentar intolerância à lactose, a  $\beta$ -galactosidase se torna uma enzima de grande importância. Possui vasta aplicabilidade, além de hidrolisar a lactose, é capaz de catalisar reações de transgalactosilação para produzir galactosídeos e oligossacarídeos, prebióticos de grande relevância pois possuem vantagens nutricionais (MUHAMMED ALSHANBERI et al., 2021).

O uso da enzima em sua forma livre nem sempre é o mais viável, pois pode resultar em altos custos devido as perdas por desnaturação e para contornar essa problemática surgiu a imobilização enzimática com o objetivo de melhorar a sua estabilidade em aplicações biotecnológicas e reduzir o custo dos processos em que se utilizam a enzima, além disso propicia a possibilidade de reutilizar a enzima e de modo geral, pode proteger a mesma de possíveis desnaturações que possam ocorrer durante a sua utilização (MUHAMMED ALSHANBERI et al., 2021).

Vários métodos podem ser usados para este fim e a escolha do método deve ser feito com base em diversos fatores como, produtividade, estabilidade, atividade residual, armazenamento, custo, tamanho das partículas, material da parede, entre outros fatores (PEANPARKDEE; IWAMOTO; YAMAUCHI, 2016; REIS et al., 2019). O estudo da microencapsulação em spray dryer de células de *Kluyveromyces marxianus* que expressam atividade de  $\beta$ -galactosidase é justificado por suas implicações práticas, econômicas e científicas, com potencial para impactar positivamente a indústria e a pesquisa na área.

## 1.1 OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do material de parede na estabilidade da  $\beta$ -galactosidase presente na célula de *Kluyveromyces marxianus* microencapsulada em *spray dryer* com diferentes materiais de parede e verificar as propriedades das micropartículas após a secagem. Os objetivos específicos deste trabalho foram:

- Caracterizar físico-quimicamente as partículas formadas quanto à umidade, atividade de água, rendimento, higroscopicidade, solubilidade;
- Avaliar a morfologia da micropartícula por meio da microscopia eletrônica de varredura (MEV) e da espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR);
- Caracterizar a enzima presente na célula após a microencapsulação em relação à estabilidade ao pH, temperatura e estocagem.

## 1.2 ESTRUTURA DO TRABALHO

Este trabalho está estruturado em capítulos. No primeiro capítulo apresenta-se uma introdução generalizada sobre o tema, abordando a justificativa e relevância do tema. O segundo capítulo é composto por um artigo de revisão da literatura e suas seções contemplam os assuntos referentes a enzimas, materiais de parede, métodos de imobilização, estudos relevantes referentes ao tema e referências da literatura utilizadas no artigo. O terceiro capítulo refere-se a um artigo intitulado como “Efeito de diferentes materiais de parede na formação de micropartículas de células de *kluyveromyces marxianus* que expressam atividade de  $\beta$ -galactosidase”, e suas seções contemplam os materiais e métodos, resultados e discussões, conclusões e as referências da literatura utilizadas no primeiro e no terceiro capítulos.

## **CAPÍTULO 2 - REVISÃO DA LITERATURA: ASPECTOS GERAIS RELACIONADOS À MICROENCAPSULAÇÃO DE $\beta$ - GALACTOSIDASE**

### 2.1 INTRODUÇÃO

O uso de enzimas em processos industriais tem sido cada vez mais comum como alternativa aos processos químicos que geram substratos indesejados. A crescente preocupação com a ingestão de produtos que possam causar danos à saúde ou ao meio ambiente impulsiona estudos que buscam minimizar ou extinguir tais efeitos (SOARES et al., 2020; TRIBST; AUGUSTO; CRISTIANINI, 2013).

Dentre as enzimas com alto apelo comercial, a enzima  $\beta$ -galactosidase se destaca por sua funcionalidade e impotância. Sua função primária é realizar a hidrólise da lactose além de participar da síntese dos outros compostos como galacto-oligossacarídeos (GOS) e lactulose (CARDOSO et al., 2017; GÜRDAŞ; GÜLEÇ; MUTLU, 2012; SOUSA et al., 2021; TORRES et al., 2010). A reação de hidrólise da lactose realizada pela  $\beta$ -galactosidase, resulta em várias vantagens tecnológicas como maior poder adoçante; redução da cristalização da lactose; diminuição da incidência de reação de Maillard; desenvolvimento de produtos específicos para intolerantes à lactose, entre outros (DOMÍNGUEZ-JIMÉNEZ; FERNÁNDEZ-SUÁREZ, 2017; GÄNZLE; HAASE; JELEN, 2008; JUAJUN et al., 2011).

As enzimas são suscetíveis a fatores como pH, temperatura, tempo, entre outros, por isso é um desafio preservar sua atividade enzimática por longos períodos. Para muitas aplicações industriais, o uso de enzimas livres, incluindo  $\beta$ -galactosidase, pode significar um aumento considerável no custo do processo por não serem reutilizáveis. Portanto, é comum o uso de enzimas imobilizadas. Ao comparar as enzimas imobilizadas com as enzimas livres, nota-se algumas vantagens da enzima imobilizada, como possibilidade de reutilização, maior estabilidade e, em alguns casos, elimina a necessidade de armazenamento sob refrigeração (AMERI; MAA, 2006; NAMALDI; ÇALIK; ULUDAG, 2007; SHAFI; AHMED; HUSAIN, 2021).

Este trabalho tem por finalidade revisar a microencapsulação da enzima  $\beta$ -galactosidase, incluindo diferentes tipos de polímeros para revestimento e diversas fontes de obtenção da enzima  $\beta$ -galactosidase bem como métodos e perspectivas de imobilização enzimática para aplicação de  $\beta$ -galactosidasas imobilizadas em setores industriais.

## 2.2 ENZIMAS INDUSTRIAIS

Enzimas têm sido usadas e exploradas para os mais diversos propósitos desde o passado distante. Produtos amplamente conhecidos como vinho, vinagre, cerveja, pão, queijos, massas, entre outros, são obtidos por meio de processos fermentativos e enzimáticos (FASIM; MORE; MORE, 2021; KIRK; BORCHERT; FUGLSANG, 2002). No Quadro 2.1 está evidenciada uma variedade de enzimas que são utilizadas em indústrias com diferentes aplicabilidades.

Quadro 2.1 - Versatilidade de utilização de enzimas que se estendem aos mais variados tipos de indústrias.

<b>Indústria</b>	<b>Enzima</b>	<b>Aplicação</b>	<b>Referência</b>
Alimentação animal	Amilase; Polissacaridase	Suplemento alimentar	Bedford (2018)
Panificação	Amilase; $\alpha$ -amilase; $\beta$ -amilase; Glucoamilase	Maciez e volume do pão; estabilidade, fortalecimento e condicionamento da massa; branqueamento do pão; biscoitos; força da massa	Hamer (1995) Pourmohammadi e Abedi (2021)
Bebida	Lactase; Celulase; Xilanase; Pectinase; Acetolactato; Descarboxilase	Despectinização; clarificação e tratamento de sucos; produção de cerveja; rolha de cortiça	Patel et al. (2016)
Detergentes	Celulases; Lipases; Peroxidase; Amilases; proteases	Limpeza; clarificação da cor; removedor de manchas; remoção de manchas de proteínas; remoção de manchas de amido, remoção de manchas de lipídios	Olsen e Falholt (1998) Singh et al. (2021)
Laticínios	Galactosidases; Proteases; Lipases	Coagulação do leite, confere sabor do queijo; remoção de lactose; confere textura em produtos à base de frutas; modificar propriedades viscoelásticas	James et al. (2009); Patel et al.(2016); Sutay Kocabaş et al. (2022)
Óleos e gorduras	Lipases	Transesterificação	Posorske (1984); Guo et al. (2005)

Continua.

Cont. Quadro 2.1 - Versatilidade de utilização de enzimas que se estendem aos mais variados tipos de indústrias.

<b>Indústria</b>	<b>Enzima</b>	<b>Aplicação</b>	<b>Referência</b>
Couro	Protease	Bateção; decapagem	Fang et al (2017); Fotouh et al. (2016)
Produtos de higiene	Lipases	Antimicrobiano; branqueamento	Sunar et al (2016)
Farmacêutica	Galactosidases	Produção de galactooligosacarídeos; produção de lactulose; biossensores	Bertoni et al. (2018)
Polpa e papel	Xilanase, Celulases, Lacases, Lipases	Controle de contaminantes; remoção de biofilme; revestimento de amido; modificação de fibra	Bajpai (1999); Demuner et al. (2011)
Textil	Amilase, Protease, Catalase, Celulase, Pectinase	Amaciamento de algodão; lavagem; terminação de alvejante; branqueamento; remoção do excesso.	Chen et al. (2007)
Tratamento de resíduos	Galactosidases	Tratamento de água poluída;	Buckley (2010) Lawton (2021)

Na indústria alimentícia a aplicação da tecnologia enzimática é notória, visto que esses biocatalisadores permitem a formação de compostos desejáveis abrangendo a verdadeira produção do alimento, mas também propiciam a formação de compostos que podem levar à perda de qualidade. Deste modo é possível afirmar que certos alimentos não poderiam se quer existir sem a ação das enzimas (KIRK; BORCHERT; FUGLSANG, 2002).

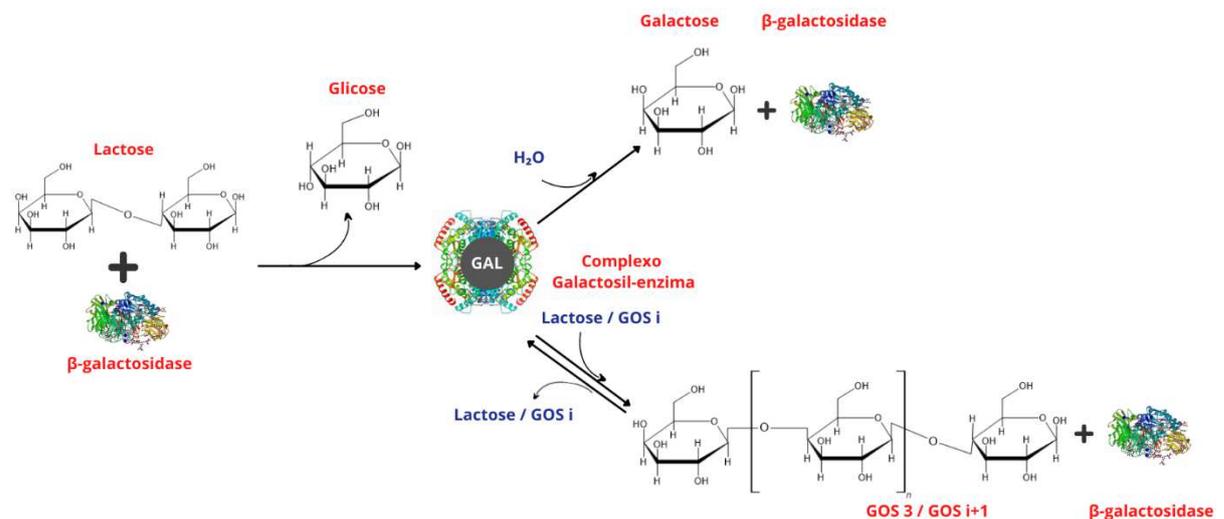
### 2.2.1 Enzima $\beta$ -galactosidase e seu mecanismo de ação

As  $\beta$ -galactosidases (E.C. 3.2.1.23) pertencem à família das hidrolases glicosídicas (GENNARI et al., 2021) e são classificadas estruturalmente em quatro grupos (GH 1, GH 2, GH 35 e GH 42), e de acordo com sua classe, a  $\beta$ -galactosidase podem apresentar variações estruturais (ALBUQUERQUE et al., 2021).

As propriedades das  $\beta$ -galactosidases podem variar de acordo com sua fonte de obtenção, mas no geral a faixa de peso molecular é de 115kDa -205 kDa, o pH ótimo está entre 3,5 - 7,5, pH de estabilidade de 2,5 - 8 e temperatura ótima 35 °C – 60 °C (SHUKLA; WIERZBICKI, 2009; VOORDE et al., 2014).

A  $\beta$ -galactosidase, enzima responsável pela hidrólise da lactose através de seus sítios ativos locais, hidrolisa resíduos terminais não redutores  $\beta$ -D-galactose em  $\beta$ -D-galactosídeos (ARGENTA; NOGUEIRA; SCHEER, 2021; CAREVIC et al., 2015). Podem catalisar reações hidrolíticas e de transgalactosilação (Figura 2.1) dependendo das condições do processo em que o substrato e a enzima estão (VERA et al., 2020), e os parâmetros que afetam a atividade da  $\beta$ -galactosidase incluem pH da solução aquosa, tempo de contato, tempo de reação, concentração e temperatura (CARGNIN; GASPARIN; PAULINO, 2020).

Figura 2.1 - Mecanismo simplificado para síntese de GOS e hidrólise da lactose.



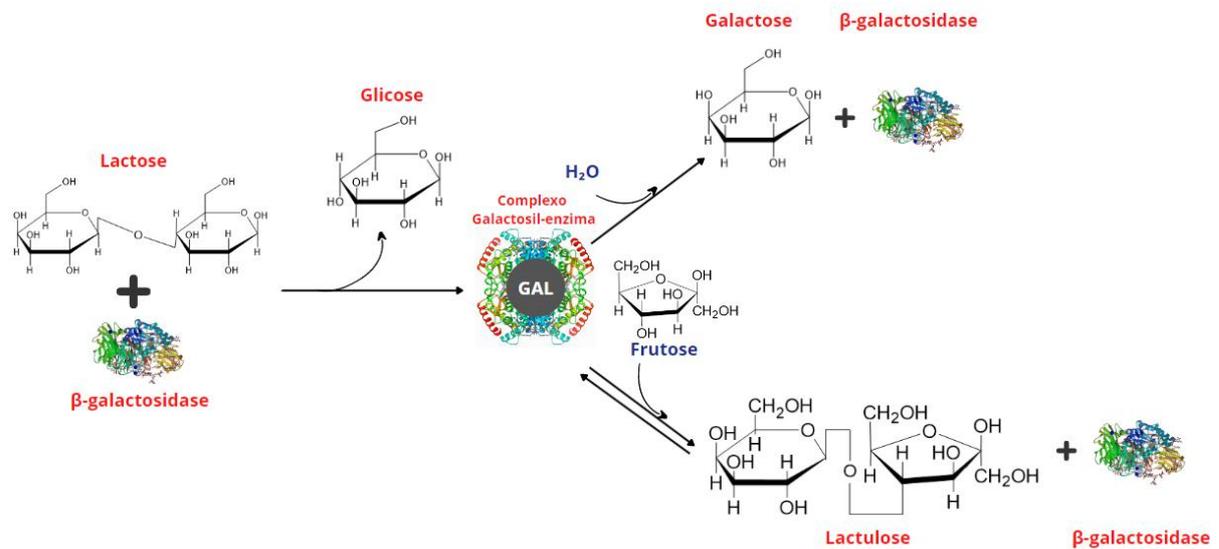
Fonte: Elaborado pelos autores (2023).

O tri-sacarídeo (GOS 3) é o primeiro produto da transgalactosilação e em seguida, mais unidades de galactose são adicionadas sequencialmente para produzir a cadeia mais longa GOS 4, GOS 5 e assim por diante. Normalmente, “i” varia de 4 a 7.

A concentração inicial de lactose influencia significativamente na produção de GOS, e altas concentrações iniciais de lactose levam a maiores rendimentos de GOS devido à diminuição da atividade de água e maior disponibilidade de aceptores de enzimas (SASS; JÖRDENING, 2020).

Quando a hidrólise enzimática da lactose é realizada na presença de frutose, a fração galactosil pode ser ligada ao átomo C4 da frutose, formando assim o dissacarídeo lactulose (Figura 2.2) (SCHUSTER-WOLFF-BÜHRING; FISCHER; HINRICHS, 2010).

Figura 2.2 - Mecanismo simplificado para síntese de lactulose.



Fonte: Elaborado pelos autores (2023).

A lactulose pode ser sintetizada por método químico, eletroativação e enzimático, com o uso da lactose como matéria-prima, o que é comum (NOOSHKAM; BABAZADEH; JOOYANDEH, 2018). O método químico requer condições bruscas de temperatura e pH, além disso requer substratos de elevada pureza e muitos reagentes resultando na formação de produtos que podem ser tóxicos, deste modo torna-se preferível a rota biológica que é vista como mais eficiente para a síntese deste dissacarídeo e pode ser realizada com substratos alternativos como o permeado de soro (DALMEIDA et al., 2018).

Outras funções biológicas dessas enzimas incluem a degradação de polissacarídeos que ocorrem nas paredes celulares das plantas, degradação de glicolipídios e proteoglicanos em mamíferos e metabolismo de galactosídeos em microrganismos (SEDDIGH; DARABI, 2014; VERA et al., 2020).

### 2.2.1.1 Fontes

Diferentes organismos vivos, como microrganismos, animais e plantas, são fontes de β-galactosidases. Os microrganismos utilizados para a extração da enzima β-galactosidase são leveduras, fungos e bactérias (HAIDER; HUSAIN, 2009). A levedura *Kluyveromyces lactis* é amplamente utilizada (FACIN et al., 2015; KLEWICKI, 2007) e os produtos obtidos a partir desses microrganismos são reconhecidos como seguros (*status* GRAS) para consumo humano

(EL-SALAM; IBRAHIM; AMER, 2020). Entre as vantagens de se utilizar microrganismos para a obtenção da  $\beta$ -galactosidase são sua alta atividade, estabilidade e facilidade de fermentação onde são facilmente obtidas com altos rendimentos (SAQIB et al., 2017).

A produção de  $\beta$ -galactosidase a partir de microrganismos tem se mostrado muito econômica e eficaz. O crescimento de microrganismos pode ser realizado em bateladas ou por fermentação contínua, e a produção pode ser favorecida com a incorporação de coadjuvantes como suplementos enzimáticos; no entanto, a enzima extraída das células é mais suscetível às variações ambientais (XAVIER; RAMANA; SHARMA, 2018).

A origem das  $\beta$ -galactosidasas têm influência significativa na atividade destas enzimas, sendo um dos principais fatores que podem favorecer ou desfavorecer as reações de hidrólise e transgalactosilação, além disso a fonte de obtenção também influencia na estabilidade e condições ótimas de temperatura e pH. Por exemplo, as  $\beta$ -galactosidasas de *Aspergillus oryzae* e *Bacillus circulans* têm atividade de transgalactosilação mais intensa, enquanto as de *Kluyveromyces lactis* e *Kluyveromyces fragilis* tendem a favorecer a hidrólise (ALBUQUERQUE et al., 2021). No Quadro 2.2 estão apresentadas diferentes fontes para obtenção de  $\beta$ -galactosidasas e alguns exemplos de aplicação.

Quadro 2.2 - Diferentes fontes de  $\beta$ -galactosidase estudadas.

<b>Microrganismo</b>	<b>Espécie</b>	<b>Aplicação</b>	<b>Referências</b>
Leveduras	<i>Kluyveromyces (Saccharomyces) lactis</i>	Aplicação em tecnologia de leites, hidrólise de lactose, hidrólise de soro de leite para produção de etanol, síntese de lactulose de soro de queijo, síntese de lactulose	Souza et al. (2018); Ricardi et al. (2018); Beniwal et al. (2018); Albuquerque et al. (2018); Cargnin et al. (2020); Wolf et al. (2021); Lima et al. (2021); Neto et al. (2021)
Bactérias	<i>Escherichia coli</i>	Hidrólise da lactose em produtos lácteos	Estevinho et al. (2014a) Estevinho et al. (2014b) Estevinho et al. (2015) Burgos et al. (2019)

Continua.

Cont. Quadro 2.2 Quadro 2.1. - Diferentes fontes de  $\beta$ -galactosidase estudadas.

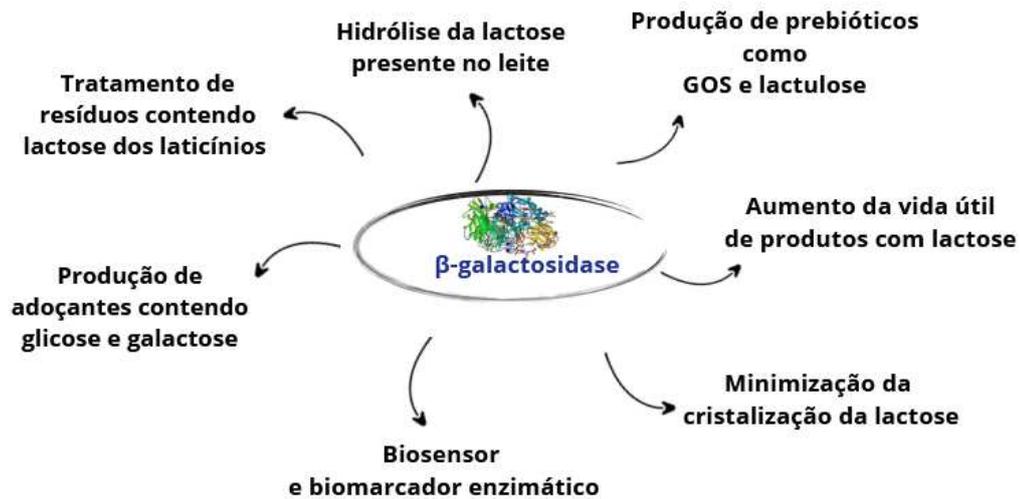
<b>Microrganismo</b>	<b>Espécie</b>	<b>Aplicação</b>	<b>Referências</b>
Bactérias	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	Hidrólise da lactose	Tizchang et al. (2021)
	<i>Bacillus licheniformis</i>	Hidrólise da lactose em produtos lácteos	Kuribayashi et al. (2021)
	<i>Bacillus circulans</i>	Produção de galacto-oligossacarídeos	Sen et al. (2014) Hackenhaar et al. (2021)
	<i>Lactobacillus leichmannii</i>	Produção de galacto-oligossacarídeos	Ji et al. (2020)
Fungos	<i>Aspergillus oryzae</i>	Hidrólise da lactose do leite e do soro de leite, síntese de lactulose, produção de galacto-oligossacarídeos, produção de ácido glucônico	Haider and Husain (HAIDER; HUSAIN, 2009)
			Husain et al. (2011)
			Guidini et al.(2011)
<i>Aspergillus niger</i>	Hidrólise da lactose	Guerrero et al. (2015)	
		Klein et al.(2016)	
		Souza et al. (2019b)	
<i>Aspergillus laticoffeatus</i>	Síntese de lactulose e galacto-oligossacarídeos	Sass and Jördening (SASS; JÖRDENING, 2020)	
		Arsalan et al. (2020)	
			Todea et al. (2021)
			Martarello et al. (2019)
			Cardoso et al. (CARDOSO et al., 2017)

### 2.3 $\beta$ -GALACTOSIDASE APLICADA A PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS

A utilização da enzima  $\beta$ -galactosidase é vasta (Figura 2.3); pode ser aplicada na indústria alimentícia, em aplicações ambientais, em indústrias farmacêuticas, além de ser essencial para a digestão da lactose. A enzima desempenha um papel vital no corpo humano,

responsável pela eliminação de resíduos de galactose de diferentes substratos, como glicoproteínas, gangliosídeos e esfingolipídeos (DAMIN et al., 2021; SHARMA; SHARMA; LEBLANC, 2021).

Figura 2.3 - Aplicações de  $\beta$ -galactosidase microbiana.



Fonte: Elaborado pelos autores (2023).

Outros usos da enzima foram relatados:

- produção de adoçante para adoçar sorvetes, panificação e confeitaria, pois a hidrólise da lactose resulta em dois monossacarídeos com maior poder adoçante (XAVIER; RAMANA; SHARMA, 2018);
- auxiliar na síntese de suplementos energéticos à base de soro de leite ou no tratamento do soro de leite antes de descartá-lo na natureza, pois a lactose no soro aumenta a Demanda Química de Oxigênio (DQO) e a Demanda Biológica de Oxigênio (DBO) da água e atua como um poluente ambiental (SHAFI; AHMED; HUSAIN, 2021);
- glicosilação de vários compostos, através de  $\beta$ -galactosidase como doador de glicosil,  $\beta$ -glicosidases podem glicosilar compostos como álcoois alifáticos, aminoácidos, nucleosídeos, antibióticos, açúcares, álcoois de açúcar, produtos glicosídeos naturais e semelhantes; além disso, as  $\beta$ -glicosidases também podem ser usadas para liberar agliconas fenólicas de suas ligações glicosídicas e, portanto, podem aumentar a quantidade e a atividade nutracêutica de antioxidantes fenólicos (LU et al., 2020);
- síntese de lactulose (4-O- $\beta$ -D-galactopiranosil-D-frutose), um importante dissacarídeo, prebiótico, medicamento para o tratamento da constipação crônica e encefalopatia

hepática (UBILLA et al., 2020); os biocatalisadores são essenciais para o processo de obtenção da lactulose, visto que o processo químico é caro e de baixo rendimento (SEREY et al., 2021);

- biossensor enzimático por meio da integração entre o analito, a enzima redox e o eletrodo para medir o teor de lactose em alimentos (SHARMA; LEBLANC, 2017);
- biomarcador para detecção de senescência e câncer (SHARMA; SHARMA; LEBLANC, 2021).

### 2.3.1 Pessoas intolerantes à lactose

A grande importância da produção da enzima  $\beta$ -galactosidase em escala industrial está associada à incapacidade de digerir a lactose (RATAJCZAK et al., 2021). A intolerância à lactose é causada por uma diminuição geneticamente programada da galactosidase intestinal após o desmame (SURI et al. 2019). Existem três tipos de intolerância à lactose: congênita, primária e secundária: i) deficiência congênita de lactase - uma doença autossômica rara associada à ausência de expressão de lactase em recém-nascidos (PORZI et al., 2021); ii) deficiência primária - perda da atividade da lactase na idade adulta devido a vários polimorfismos na região promovendo a transcrição do gene da lactase (SZILAGYI; ISHAYEK, 2018) e iii) deficiência secundária - geralmente transitória, causada por gastroenterite infecciosa que afeta a atividade da lactase (MISSELWITZ et al., 2019).

Os sintomas gastrointestinais típicos da intolerância à lactose incluem inchaço, diarreia, gases, dor intestinal, borborismo e flatulência (BOUCHOUCHA et al., 2021; VARJÚ et al., 2020), geralmente ocorrem dentro de algumas horas após o consumo de alimentos que contêm lactose (JANSSON-KNODELL et al., 2020). Os sintomas são inespecíficos e a intensidade varia de acordo com a quantidade de lactose ingerida e a suscetibilidade individual (MARTÍNEZ VÁZQUEZ et al., 2020).

Uma solução simples para pessoas com intolerância à lactose é excluir total ou parcialmente os alimentos que contêm lactose da dieta (CATANZARO; SCIUTO; MAROTTA, 2021). No entanto, esses alimentos são nutricionalmente ricos; portanto, surge a importância do uso da enzima  $\beta$ -galactosidase nas indústrias de alimentos para a produção de produtos com baixo teor de lactose, atendendo assim às necessidades das pessoas com intolerância à lactose (MOVAHEDPOUR et al., 2022).

A remoção da lactose do leite e produtos lácteos os torna aceitáveis para pessoas com intolerância à lactose, de modo que a indústria de laticínios dedicou recursos significativos para

desenvolver a hidrólise da lactose através da  $\beta$ -galactosidase (BASSO; SERBAN, 2019) em produtos como leite, iogurtes, queijo cottage (SAQIB et al., 2017), queijo coalho, sorvete e manteiga (NIVETHA; MOHANASRINIVASAN, 2017).

### 2.3.2 Galacto-oligossacarídeos (GOS)

A produção de alimentos prebióticos é de grande interesse da indústria e dos consumidores; assim, a enzima  $\beta$ -galactosidase tem mostrado sua importância, pois tem sido utilizada para obter importantes prebióticos (GOS) (PANESAR et al., 2018). GOS são reconhecidos como ingredientes valiosos na nutrição humana e animal. Na indústria alimentícia, são usados em fórmulas e outros alimentos infantis para estimular o crescimento de bifidobactérias no cólon de bebês (JI et al., 2021; SASS; JÖRDENING, 2020; TODEA et al., 2021), além de sua aplicação como ingredientes funcionais (prebióticos) que tem crescido, principalmente em bebidas e laticínios (ESKANDARLOO; ABBASPOURRAD, 2018).

Dentre as vantagens do GOS, destacam-se: indução da sensação de saciedade; adoçantes de baixa caloria, baixo índice glicêmico e não cariogênicos; importante no controle do peso corporal; alívio da constipação; propriedades prebióticas podem ser facilmente incorporadas em muitos produtos (URETA et al., 2020); auxiliam na absorção de cálcio, magnésio e fósforo, melhorando o equilíbrio mineral do corpo (VAN LEUSEN et al., 2014) e promovem a regulação das bifidobactérias no intestino humano e a inibição de bactérias intestinais potencialmente nocivas (EL-SALAM; IBRAHIM; AMER, 2020).

A produção de GOS em escala industrial se dá através do soro de leite, que é gerado em grandes quantidades em todo o mundo; na Europa, por exemplo, foram produzidas 55,5 milhões de toneladas em 2020 (EUROSTAT, 2020); sendo utilizada como fonte primária de lactose (SCOTT; VERA; CONEJEROS, 2016). No entanto, outros coprodutos lácteos ricos em lactose podem ser usados como leite e permeado de soro (ESKANDARLOO; ABBASPOURRAD, 2018; FARA et al., 2020; PASSOS et al., 2021; RICO-RODRIGUEZ et al., 2021).

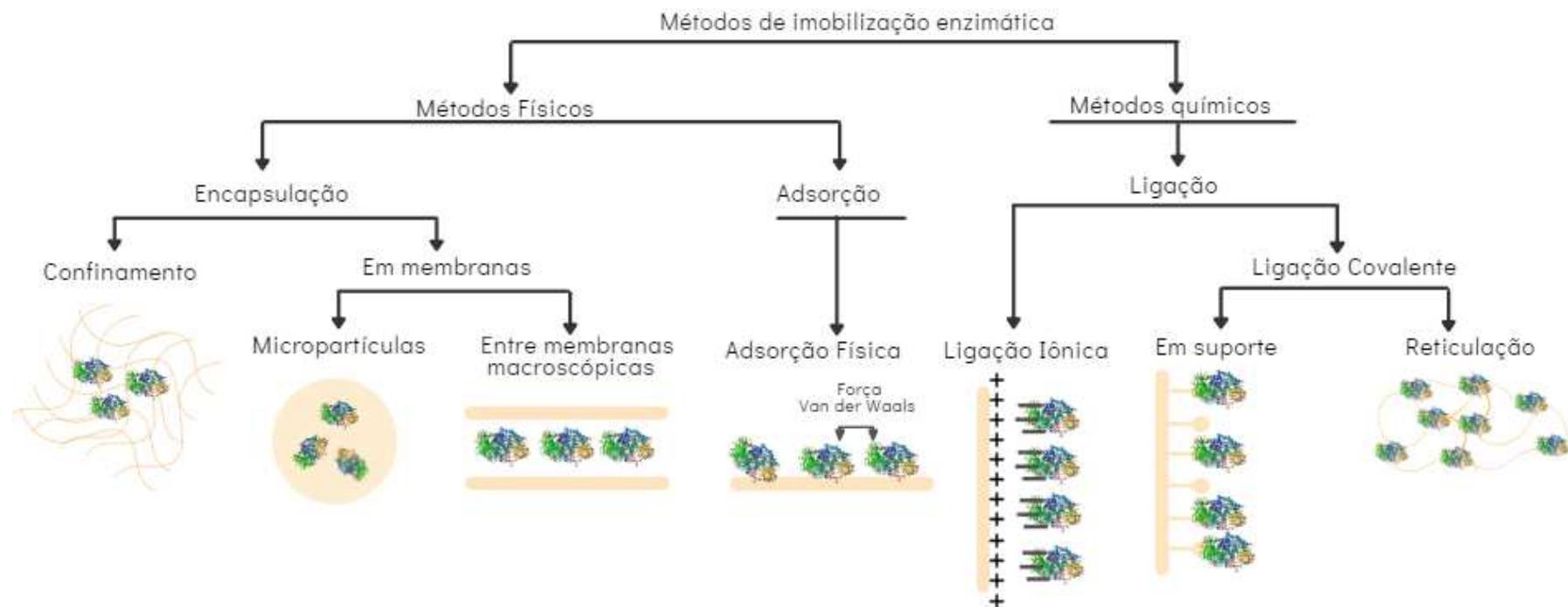
## 2.4 MÉTODOS DE IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA

Existem diferentes métodos de imobilização enzimática, mostrados na Figura 2.4. Em geral, os métodos podem ser divididos em físicos e químicos, com base nos diferentes tipos de ligações ou interações que podem ser feitas. Os métodos físicos são caracterizados por suas ligações fracas e são exemplos adsorção e encapsulamento. Os métodos químicos, por sua vez,

envolvem ligações covalentes ou reticulação (HANAUER et al., 2021; KIM; GRATE; WANG, 2006; SHELDON; VAN PELT, 2013; ZHANG; ZHANG; MCCLEMENTS, 2017).

O método de imobilização deve ser escolhido com cuidado, considerando o tipo de ligação desejada entre o suporte e a enzima, o ciclo de reutilização e a finalidade (RIBEIRO et al., 2021). Além disso, é possível utilizar o método de imobilização isoladamente ou em combinação para obter formas eficientes de alterar a especificidade, seletividade, atividade e estabilidade das enzimas (MATEO et al., 2007).

Figura 2.4 - Métodos de imobilização enzimática.



Fonte: Elaborado pelos autores (2023).

## 2.4.1 Métodos físicos

### 2.4.1.1 Adsorção

A adsorção enzimática consiste em interações reversíveis fracas entre o adsorvente e o adsorbato através de ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas e forças predominantemente de Van der Waals (HANAUER et al., 2021). O suporte é imerso na enzima para adsorção física ou seco nas superfícies dos eletrodos; assim, as enzimas adsorvidas são protegidas da agregação, proteólise e interação com interfaces hidrofóbicas (DATTA; CHRISTENA; RAJARAM, 2013).

A imobilização enzimática por adsorção tem vantagens, como condições de preparação suaves e fáceis, baixo custo, sem aditivos químicos, especialmente reagentes de reticulação, alta carga enzimática e regeneração do suporte para vários usos (THANGARAJ; SOLOMON, 2019). Apesar de simples de se realizar, a estabilidade é baixa devido à lixiviação das enzimas adsorvidas (KIM et al., 2008). O método de adsorção utiliza carreadores insolúveis em água, como derivados de polissacarídeos, polímeros sintéticos e vidro (DATTA; CHRISTENA; RAJARAM, 2013). O processo de adsorção física geralmente gera mudanças significativas no microambiente da proteína e normalmente envolve a adsorção multiponto de proteínas entre uma única molécula de proteína e uma série de sítios de ligação na superfície de imobilização (MERYAM SARDAR, 2015).

Hussain et al. (HUSAIN et al., 2011) imobilizaram com sucesso a  $\beta$ -galactosidase por adsorção em ZnO e ZnO-NP nativos, exibindo 60% e 85% de rendimento de imobilização, respectivamente. Tizchang et al. (TIZCHANG et al., 2021) imobilizaram a  $\beta$ -galactosidase por adsorção em nanotubos de haloisita obtendo 89,5% de rendimento. Sel et al. (2020) obtiveram um rendimento de 76% de imobilização de catalase por adsorção em copolímeros de poli [metil metacrilato-co-poli (etileno glicol) metacrilato].

### 2.4.1.2 Encapsulamento

Um dos métodos amplamente utilizados para imobilização é o encapsulamento enzimático, este método consiste em imobilizar enzimas dentro de matrizes porosas, melhorando sua estabilidade criando um microambiente protetor ou atuando como barreira física ao meio externo (ZHANG; ZHANG; MCCLEMENTS, 2017). Em outras palavras, o

confinamento enzimático em uma membrana ou encapsulamento enzimático é um processo que consiste em confinar enzimas dentro de membranas semipermeáveis com permeabilidade controlada e seletiva (THANGARAJ; SOLOMON, 2019).

Na técnica de microencapsulação, o carregamento da enzima depende apenas do espaço vazio dentro do envelope criado durante a formação do gel – quanto mais espaço significativo dentro do gel, melhor o aprisionamento (SEN et al., 2014).

O processo é simples, barato e atraente depois de capturar muitas biomoléculas. O método de encapsulamento limita o movimento, mas permite o reconhecimento e a catálise do substrato. Géis de origem natural ou sintética são amplamente utilizados como material de suporte encapsulante (SNEHA; BEULAH; MURTHY, 2019). Aprisionar enzimas em géis ou fibras é um método conveniente para uso em processos envolvendo substratos e produtos de baixo peso molecular (MERYAM SARDAR, 2015). A imobilização por aprisionamento mostrou-se adequada, pois o rendimento pode chegar a mais de 85% e com uma perda de atividade enzimática relativamente baixa (ARGENTA; NOGUEIRA; SCHEER, 2021).

## 2.4.2 Métodos químicos

### 2.4.2.1 *Ligação covalente*

A ligação covalente é um dos métodos de imobilização enzimática mais sofisticados e estáveis de ligação enzima-carreador, que impede a eluição da proteína em solução e, em alguns casos, é capaz até de melhorar a atividade e a afinidade da enzima. No entanto, os métodos covalentes podem ser relativamente caros e complicados, pois na maioria dos casos, o suporte requer ativação inicial, e algum bloqueio de grupos reativos livres é recomendado após a imobilização (GARCIA-GALAN et al., 2011; SOUZA; GARCIA-ROJAS; FAVARO-TRINDADE, 2018; ZUCCA; SANJUST, 2014).

O método de ligação covalente estabiliza consideravelmente a atividade da enzima, mas requer longos processos para ligar covalentemente as moléculas da enzima à superfície do suporte (KIM et al., 2008). No entanto, a imobilização enzimática por ligação covalente geralmente garante a maior força de ligação entre o suporte e a enzima, além disso, geralmente não interfere na transferência de massa reagente-produto e garante uma estabilidade operacional em condições extremas (ZUCCA; SANJUST, 2014).

#### 2.4.2.2 Reticulação

A reticulação química é a ligação covalente estável de duas ou mais moléculas. O processo é amplamente utilizado para imobilização enzimática, e também é usado para estabilizar a estrutura da proteína ou identificar parceiros de interação desconhecidos. Os grupos funcionais nas extremidades da molécula do agente de reticulação reagem diretamente com as cadeias laterais de aminoácidos de superfícies específicas da proteína alvo. Esses grupos funcionais são aminas primárias, carboxílicas, sulfidrilas ou carbonilas (KAZENWADEL et al., 2015).

Por reticulação, podem ser formados agregados enzimáticos reticulados (CLEA) ou cristais enzimáticos reticulados (CLEC). Os CLECs são obtidos através da precipitação controlada de enzimas (forma pura) em microcristais seguida de reticulação através do uso de reagentes bifuncionais formando ligações covalentes entre grupos reativos livres na superfície dos cristais da enzima. Suas características são armazenamento prolongado, insolubilidade em solução tampão e solventes orgânicos; recuperação e reutilização; processo de aquisição oneroso. Os CLEAs são formados a partir da precipitação da enzima (pura ou não), depois sofrem reticulação química usando reagentes bifuncionais. Suas características são: insolúveis; custo reduzido em relação ao CLEC; podem formar grandes aglomerados que causam limitações de difusão do substrato à enzima (GARCIA-GALAN et al., 2011).

Há grande interesse em enzimas imobilizadas sem carreadores, como CLECs e CLEAs, pois oferecem vantagens como atividade enzimática altamente concentrada combinada com alta estabilidade e baixo custo de produção. Por outro lado, a imobilização com adição de suportes, tem um custo de produção maior, pois requer um suporte adicional, além disso, o uso de um suporte durante a reticulação resulta em uma baixa atividade enzimática devido à introdução de grande parte de não-lastro catalítico, atuando como diluente da atividade enzimática, resultando em menores rendimentos e produtividade (SHELDON; VAN PELT, 2013).

A reticulação previne o processo de lixiviação, preservando a estabilidade, criando agregados enzimáticos. No entanto, isso pode reduzir sua bioatividade devido à baixa flexibilidade e limitações de difusão (LEE et al., 2021). Sob condições de agitação severa por uma semana, as enzimas reticuladas mostraram diminuição insignificante da atividade. Em contraste, abordagens convencionais, incluindo adsorção e fixação covalente, resultaram em mais de 50-90% de inativação da enzima sob a mesma condição (KIM et al., 2008).

No método de reticulação por ligação covalente, são utilizados reagentes bi ou multifuncionais, como glutaraldeído, bis(diazo)benzidina e diisocianato de hexametileno (DATTA; CHRISTENA; RAJARAM, 2013). O glutaraldeído é geralmente o agente de reticulação mais usado, pois é barato e prontamente disponível em quantidades comerciais. A reticulação ocorre através da reação de grupos amino livres de resíduos de lisina, na superfície de moléculas enzimáticas próximas, com oligômeros ou polímeros de glutaraldeído, resultando em condensações aldólicas inter e intramoleculares (SHELDON, 2011). Guidini et al. (GUIDINI et al., 2011) descobriram que a reticulação de  $\beta$ -galactosidase com glutaraldeído adsorvido em Duolite A568 aumentou a estabilidade em comparação com a enzima não reticulada após incubação a 55 °C por mais de duas horas. Guerrero et al. (GUERRERO et al., 2015) imobilizaram a referida enzima por reticulação com glutaraldeído, obtendo um rendimento de 30%.

## 2.5 MICROENCAPSULAÇÃO DA ENZIMA B-GALACTOSIDASE E DE CÉLULAS QUE EXPRESSAM ATIVIDADE ENZIMÁTICA

A microencapsulação é um método de imobilização por confinamento que protege um composto ativo chamado núcleo através de uma barreira física. A técnica consiste em aprisionar gotículas líquidas, partículas sólidas ou compostos gasosos em filmes finos constituídos por uma matriz homogênea ou heterogênea (GHARSALLAOUI et al., 2007).

O método de microencapsulação deve ser escolhido de acordo com a finalidade específica do produto final, dando importância a fatores como tamanho de partícula desejado, propriedades físicas e químicas do núcleo e da parede, mecanismos de liberação desejados, custo, aplicabilidade e viabilidade do processo (POLYAKOV et al., 2004). De acordo com Sohail et al. (2011), os métodos podem ser divididos em métodos físicos, físico-químicos e químicos mostrados no Quadro 2.3.

Quadro 2.3 - Métodos de microencapsulação.

<b>Tipos</b>	<b>Métodos de microencapsulação de compostos bioativos</b>
Físico-químico	coacervação simples ou complexa, emulsificação/evaporação de solvente
Métodos Físicos	secagem por atomização, revestimento por pulverização, resfriamento por pulverização, gelificação iônica, leito

	fluidizado, centrifugação por extrusão multi-orifícios, cocrystalização, liofilização.
Métodos Químicos	polimerização interfacial, inclusão molecular ou inclusão complexa.

Desai et al. (DESAI; PARK, 2005) enunciaram os benefícios da microencapsulação como barreira contra umidade e oxigênio. Os autores também destacaram a redução da higroscopicidade do material do núcleo, liberação controlada e gradual do núcleo, facilidade de manuseio e armazenamento dos produtos, proteção das células durante o processo de secagem, proteção contra agentes químicos.

Na morfologia, é comum observar o termo microcápsula para se referir à micropartícula. No entanto, a micropartícula pode ser dividida em dois grupos, que são a microcápsula - compreende um sistema tipo reservatório - e a microesfera - compreende um sistema monolítico - como é ilustrado na Figura 2.5 (NESTERENKO et al., 2013; NUNES et al., 2015).

Figura 2.5 - Morfologia das micropartículas: microcápsula e microesfera.



Fonte: Elaborado pelos autores (2023).

Uma microcápsula é um sistema reservatório - o núcleo é definido e recoberto pelo material da parede, enquanto na microesfera - sistema monolítico - o núcleo encontra-se disperso na matriz contínua composta pelo material da parede. No sistema monolítico, o material ativo pode ser disperso no interior da matriz e aderido à sua superfície (NAZZARO et al., 2012; NESTERENKO et al., 2013; RAY; RAYCHAUDHURI; CHAKRABORTY, 2016).

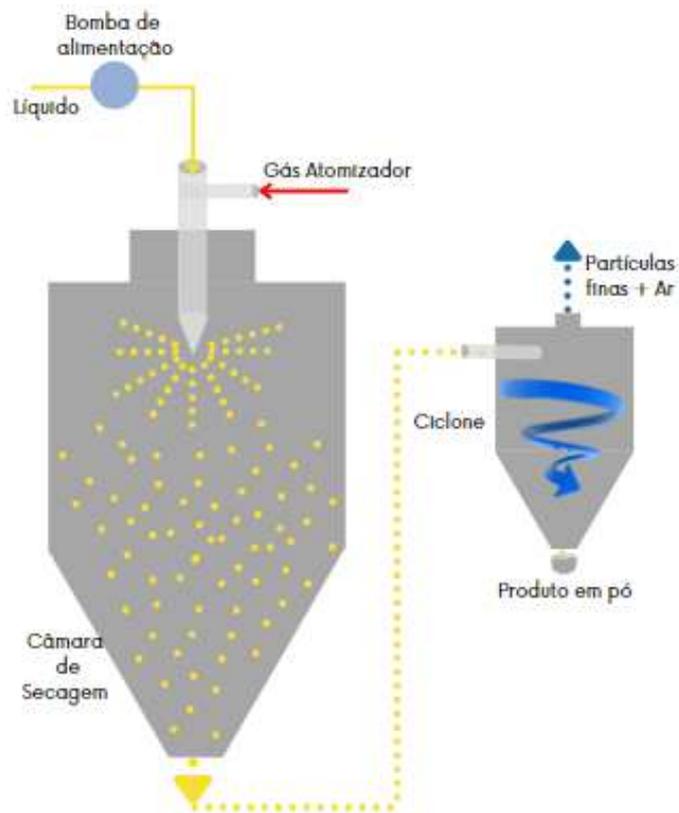
A microencapsulação envolvendo a enzima  $\beta$ -galactosidase tem sido observada de duas formas, microencapsulação da enzima e microencapsulação de células que expressam atividade da enzima como tem sido observado em diversos estudos como de Estevinho et al.

(ESTEVINHO et al., 2014a), Mukundan et al. (MUKUNDAN et al., 2020) e Zhang et al (2016) por exemplo, onde aplicam diferentes métodos para obter a microencapsulação.

### 2.5.1 Secagem por atomização

A secagem por atomização (*spray drying*) para microencapsulação de enzimas e compostos bioativos consiste em um processo no qual o líquido é disperso em uma corrente de gás aquecido, onde partículas do fluido atomizado em contato com o gás quente secam quase instantaneamente, obtendo-se um produto em pó (GHARSALLAOUI et al., 2007). É desejável que o produto obtido tenha boa qualidade, baixa atividade de água, desaglutinação, facilidade de armazenamento, além de proteger o material ativo contra reações indesejadas (CARNEIRO et al., 2013). Além disso, uma das principais vantagens do *spray drying* é a facilidade de ajuste das características das micropartículas, alterando os parâmetros operacionais do equipamento (YE; KIM; PARK, 2010).

O diagrama mostrado na Figura 2.6 ilustra como funciona o secador por pulverização. Este processo possui diversas variáveis, como a temperatura de entrada na alimentação, temperatura do ar de secagem, velocidade do ar, tempo de residência e distribuição de calor no interior do *spray dryer*. Desta forma, todos os parâmetros são decisivos para a obtenção do produto desejado e eficiência do processo (NUNES et al., 2015).

Figura 2.6 - Atomização em *Spray dryer*.

Fonte: Elaborado pelos autores (2023).

Mukundan et al. (MUKUNDAN et al., 2020) realizaram a microencapsulação de células de *Streptococcus lactis* que expressavam a atividade enzimática da  $\beta$ -galactosidase em *spray dryer*, onde foi avaliado o impacto da temperatura de entrada. A 160 °C, observou-se uma diminuição significativa da atividade relativa, mantendo apenas 2% da atividade. A melhor atividade relativa de 99% foi obtida com uma temperatura de entrada de 90 °C.

Além disso, Estevinho et al. (ESTEVINHO et al., 2014a) realizaram estudos de microencapsulação da enzima  $\beta$ -galactosidase por *spray drying* com bico padrão de 0,5 mm a uma temperatura do ar de entrada de 115 °C. As micropartículas formadas tinham um diâmetro de cerca de 3  $\mu$ m, mesmo com materiais de parede variados. Entre as enzimas microencapsuladas, as encapsuladas com goma arábica apresentaram melhor atividade inicial, superior a 35%.

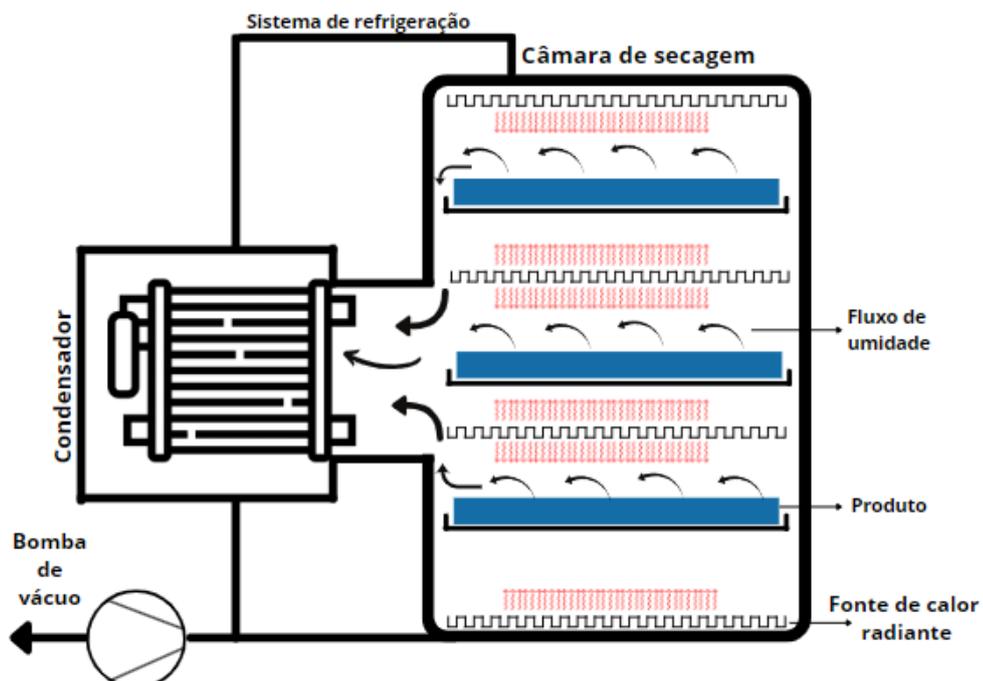
### 2.5.2 Liofilização

A liofilização consiste na secagem do material através da sublimação do solvente (geralmente água) contido no produto que é congelado a baixas temperaturas e depois submetido a uma câmara de vácuo (Figura 2.7). Essa tecnologia foi desenvolvida para superar a degradação e desnaturação de compostos sensíveis a altas temperaturas. A escolha das condições de operação impacta diretamente no desempenho do processo, e para tal escolha, devem ser realizadas análises para evitar perda de qualidade do produto (VIEIRA; NICOLETI; TELIS, 2012).

Em alguns casos, é necessário adicionar substâncias cuja premissa é proteger células, tecidos ou embriões, evitando efeitos drásticos durante as etapas de congelamento, dessa forma, os crioprotetores como a glicose, sacarose, metanol entre outros, reduzem os danos causados pelas etapas de congelamento, descongelamento e secagem (FREITAS et al., 2020).

De acordo com Sameti et al. (2003) a liofilização é um método capaz de preservar moléculas instáveis por longos períodos, incluindo fármacos biotecnológicos, como proteínas e peptídeos.

Figura 2.7 - Esquema da operação de um liofilizador.



Fonte: Elaborado pelos autores (2023).

Vasiljevic et al. (2003) estudaram a retenção da atividade da  $\beta$ -galactosidase em preparações de extrato celular bruto de *Lactobacillus bulgaricus* liofilizado, após 15 e 30 dias de armazenamento sob refrigeração a 7 °C a retenção foi de 94,9% e 88,8% respectivamente.

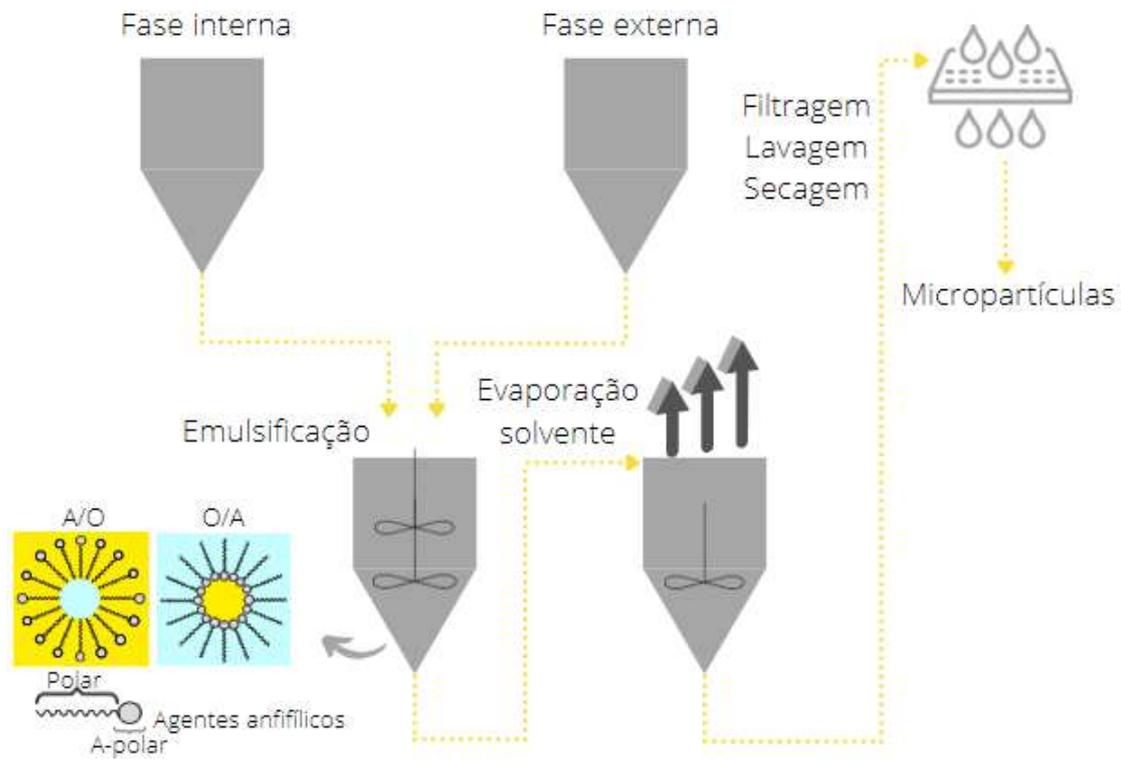
### 2.5.3 Emulsificação com evaporação de solvente

Emulsificação com evaporação de solventes é o termo designado ao conjunto de operações que dão origem à formação partículas encapsuladas por emulsões - dispersões de duas fases imiscíveis, que são estabilizadas por agentes emulsificantes capazes de interagir com as duas fases (FRANZOL; REZENDE, 2015). Elas podem ser classificadas de acordo com sua formação óleo em água (O/A) em que a fase dispersa é óleo, e a fase contínua é água ou água em óleo (A/O) conhecida como emulsão inversa. Existem também emulsões múltiplas como água-em-óleo-em-água (A/O/A) e óleo-em-água-em-óleo (O/A/O) onde uma emulsão de óleo em água é formada e essa emulsão é dispersa novamente em óleo (FOUDAZI et al., 2015).

Os surfactantes desempenham um papel fundamental na estabilização de emulsões devido à sua capacidade anfifílica; parte de sua estrutura tem característica polar e a outra extremidade tem característica apolar. Desta forma, eles podem se ligar a outras moléculas polares e não polares simultaneamente, reduzindo a tensão superficial (DALVIN, 2011).

O processo de microencapsulação ocorre da seguinte forma: a substância de interesse é dispersa na fase interna, e posteriormente adicionada à fase externa para ser então emulsificada. Após a formação da emulsão, o solvente orgânico presente é removido por evaporação sob agitação contínua. As micropartículas formadas seguem para lavagem, separação e secagem, como pode ser visto na Figura 2.8 (ZANETTI; SOLDI; LEMOS-SENNA, 2002).

Figura 2.8 - Produção de micropartículas pelo método de emulsificação/evaporação de solvente.



Fonte: Elaborado pelos autores (2023).

Ahn et al. (2013) microencapsularam  $\beta$ -galactosidase por emulsificação água-óleo-água, a concentração de 0,75% de monolaurato de polioxietileno sorbitano apresentou 82,89% de estabilidade como a mais alta. Além disso, Souza et al. (2019a) avaliaram a microencapsulação da enzima  $\beta$ -galactosidase obtida de *Aspergillus oryzae* (A.O.) e *Kluyveromyces lactis* (K.L.) através da emulsão. Em pH 7, apresentaram eficiência em torno de 98,7% e manutenção da estabilidade de 74,76% e 72,25% para *A.oryzae* e *K. lactis*, respectivamente.

## 2.6 BIOPOLÍMEROS PARA MICROENCAPSULAÇÃO

Existem diferentes tipos de materiais que podem ser utilizados na microencapsulação. Sua escolha dependerá essencialmente das particularidades da enzima e das condições de operação, como temperatura, pH, luz, oxigênio (MILETIĆ et al., 2009; SHAHIDI; HAN, 1993).

Em princípio, é desejável que o material de parede apresente: baixa viscosidade em altas concentrações, permeabilidade, estabilidade química, estabilidade mecânica, custo acessível,

fácil manuseio, baixa higroscopicidade, inerte com o agente ativo, resistência a microrganismos, solúvel em solventes comumente utilizados, insípido (SHAHIDI; HAN, 1993; TALBERT; GODDARD, 2012). É importante ressaltar que o material de parede aplicado ao alimento deve ser de grau alimentício, biodegradável e formar uma camada protetora entre o agente ativo e o meio (ZHANG et al., 2015).

A composição dos materiais de parede pode ser única ou combinada, ou seja, um ou mais compostos. O último é interessante em uma situação em que as características físico-químicas dos materiais são diferentes. Assim, sua combinação pode oferecer melhor eficiência e desempenho na microencapsulação (FERNANDES; CANDIDO; OLIVEIRA, 2012).

Os agentes encapsulantes mais utilizados com aplicação em alimentos são carboidratos, gomas, proteínas e lipídios (Quadro 2.4) (SAMANTHA et al., 2015).

Quadro 2.4 - Materiais de parede utilizados na microencapsulação de alimentos.

<b>Classe</b>	<b>Materiais de parede</b>
Carboidratos	Amido, Maltodextrina, dextranos, sacarose, celulose e derivados
Gomas	Goma arábica, goma guar, ágar, carragena, alginato
Proteínas	Glúten, caseínas, albuminas, hemoglobina, gelatinas e peptídeos
Lipídeos	Cera, parafina, diglicerídeos

Fonte: Samantha et al. (2015).

### 2.6.1 Amido

Amplamente encontrado na natureza, o amido é um carboidrato com diferentes aplicações industriais. Os grânulos são constituídos por dois tipos de polímeros, amilose e amilopectina, formados por unidades de D-glicose. A proporção de polissacarídeos muda de acordo com a origem do amido (TESTER; KARKALAS; QI, 2004). Além disso, outras substâncias podem compor o amido em níveis baixos capazes de interferir em suas propriedades físico-químicas como lipídios, minerais e compostos nitrogenados (BOBBIO; BOBBIO, 2003; LEONEL; CEREDA, 2002; ORDÓÑEZ et al., 2005).

Sua aplicabilidade no processo de microencapsulação se deve às suas características como alta disponibilidade, baixo custo, capacidade de retenção de água, viscosidade, entre outras. Além disso, alterar a estrutura química do amido pode melhorar o rendimento e alterar suas propriedades físico-químicas (PATHAN et al., 2015).

A microencapsulação realizada com amido como material de parede pode ser feita por vários métodos: secagem por pulverização, extrusão, liofilização, *spray-drying*, revestimento em leite fluidizado e inclusão molecular (NEDOVIC et al., 2011).

### 2.6.2 Maltodextrina

A maltodextrina é um polímero sacarídeo nutritivo obtido a partir do amido e a escolha do amido para extração pode depender do custo de obtenção do amido e da sazonalidade (MONTAÑEZ SOTO, 2012).

Reconhecida como segura pela Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO), é apresentada na forma de pó branco ou em soluções concentradas (STORZ; STEFFENS, 2004), é um dos carboidratos mais utilizados como revestimento de parede na microencapsulação de compostos. Suas principais vantagens para serem utilizadas no processo são: baixo custo, alta solubilidade em água, baixa higroscopicidade e umidade favorecendo a aglomeração e o aspecto pegajoso que pode se formar na parede do secador, melhorando assim o rendimento de secagem (ANEKELLA; ORSAT, 2013; KARACA; NICKERSON; LOW, 2013).

### 2.6.3 Quitosana

A quitosana é um polissacarídeo obtido através da desacetilação alcalina da quitina. A quitina é o segundo polímero mais abundante na natureza, pois pode ser encontrada nas paredes celulares de insetos, fungos e no exoesqueleto de crustáceos e moluscos (DESAI; PARK, 2005).

A estrutura molecular da quitosana é um copolímero de N-acetil-D-glucosamina e D-glucosamina que difere no grau de N-acetilação e peso molecular (KIM et al., 2007). Sua extração torna-se viável por ser obtida a partir de um subproduto da indústria do pescado, possuindo assim uma relação custo-benefício atrativa e não sendo tóxica (DESAI; PARK, 2005).

A utilização da quitosana como material de parede deve-se à sua biocompatibilidade, biodegradabilidade e efeito de permeabilidade, abundância do polímero, entre outros motivos (ARANAZ et al., 2009). Embora seja um material de parede atraente, é insolúvel em água e solúvel em soluções ácidas. No entanto, é possível alterar a estrutura da quitosana por meio de ligações químicas com grupos orgânicos funcionais para que ela tenha solubilidade em soluções aquosas neutras, comumente chamada de quitosana modificada (quitosana solúvel em água),

sendo um composto valioso para aplicações em indústrias alimentícias (ESTEVINHO et al., 2014b; SASHIWA et al., 2002; ZHANG et al., 2010).

#### 2.6.4 Goma Arábica

A goma arábica ou goma acácia, de origem vegetal, é extraída de árvores africanas, cultivadas em diferentes áreas geográficas, produzidas predominantemente no Sudão (responsável por 70% das exportações) e na Nigéria. As gomas naturais e não modificadas como a goma arábica são amplamente utilizadas na indústria alimentícia como aditivos devido às suas propriedades; dentre elas, destaca-se sua propriedade como espessante (RANDALL; PHILLIPS; WILLIAMS, 1989).

A goma arábica é um hidrocolóide compacto, ramificado e polidisperso. Ácidos carboxílicos como ácido glucurônico e galacturônico estão sempre presentes (RANDALL; PHILLIPS; WILLIAMS, 1989). Segundo a *Food Ingredients Brazil* (2011), a composição da goma varia de acordo com sua fonte de produção. A goma arábica, em geral, é constituída por 12% - 15% de água e várias enzimas (oxidases, peroxidases e pectinases), e 85% - 88% de polissacarídeos. Os polissacarídeos podem ser divididos em duas frações, uma composta por polissacarídeos (cerca de 70% da composição) que não possuem porções nitrogenadas ou possuem porções baixas. A outra fração é composta por moléculas de alto peso molecular e proteínas.

Dentre suas aplicações, a goma arábica é comumente utilizada na elaboração de aromas encapsulados na forma de pó. Através do processo de atomização a goma atua como revestimento de parede. Pode proteger compostos voláteis expostos a altas temperaturas e, além disso, é capaz de reter até os aromas mais delicados. Outra característica essencial é sua alta solubilidade em água sem interferir significativamente na viscosidade (TISS; CARRIÈRE; VERGER, 2001).

#### 2.6.5 Alginato

O alginato de sódio é um polímero extraído principalmente de algas marrons. A formação do gel ocorre na presença de sais de cálcio, gelificando instantaneamente o alginato devido à presença de cátions polivalentes (GLICKSMAN, 1987). É formado por dois monômeros, um  $\beta$ -D-Manuronil e um  $\alpha$ -L-Guluronil ligados por ligações glicosídicas, conforme mostrado na (SOUZA; PERALTA-ZAMORA; ZAWADZKI, 2008).

A composição do alginato muda em relação ao seu peso molecular e à relação entre o teor de ácido manurônico e o ácido gulurônico que ele contém (KHANNA et al., 2010). A solubilidade dos alginatos em água depende do pH do solvente, da força iônica do meio e da presença de íons gelificantes como  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Sr}^{+2}$  e  $\text{Ba}^{+2}$  no solvente (PAWAR; EDGAR, 2011).

A indústria farmacêutica e alimentícia utiliza o alginato por diversos fatores, tais como: não toxicidade, biocompatibilidade, biodegradabilidade, baixo custo para encapsular proteínas, enzimas e células (KIM et al., 2017), capacidade de formar compostos versáteis e biocompatíveis com microrganismos, entre outros fatores (GOH; HENG; CHAN, 2012).

#### 2.6.6 Interação entre polímeros e outros compostos

Além dos encapsulados e agentes encapsulantes, outros compostos podem melhorar o processo de obtenção ou a estabilidade das partículas. Por exemplo, no estudo realizado por Estevinho et al. (2014a), que avaliou a microencapsulação da enzima  $\beta$ -galactosidase com diferentes polímeros (goma arábica, quitosana, quitosana modificada, alginato de cálcio e alginato de sódio) em *spray drying* combinados com albumina de soro bovino (BSA). O uso da BSA foi justificado pela estabilização das enzimas, prevenção da termodegradação e adesão da enzima em tubos, pipetas e outros instrumentos.

O uso de agentes plastificantes também pode ser necessário, como o glicerol, quando o objetivo é a retenção de água. Sua ação contribui para a hidrofiliidade dos filmes, aumentando assim sua interação com as moléculas de água (TAPIA-BLÁCIDO; DO AMARAL SOBRAL; MENEGALLI, 2011).

Em processos de secagem cujo objetivo é remover a água, o glicerol pode prejudicar o processo pois dificulta diretamente a remoção da umidade. Portanto, não é muito adequado usar alta concentração (mais de 25%) de glicerol para encapsulamento de enzimas, pois aumenta a permeabilidade e reduz a resistência.

*Tween* é um tensoativo comumente utilizado na microencapsulação de compostos oleosos, como no estudo de Santana et al. (2014) que realizaram a microencapsulação da polpa de pequi em *spray dryer*, utilizando amido modificado como agente encapsulante e *tween* como agente tensoativo. Os autores perceberam que a concentração do surfactante teve impacto no desempenho de secagem. Segundo os autores, o uso do emulsificante em excesso (mais de 1%) leva à desestabilização da emulsão, resultando em coalescência.

Vários estudos sobre a imobilização por microencapsulação da enzima  $\beta$ -galactosidase estão sendo desenvolvidos tanto em extrato celular quanto enzimático, além do uso de diferentes materiais de revestimento, alguns estudos estão destacados no Quadro 2.5.

## Capítulo 2 – Revisão da literatura

Quadro 2.5 - Estudos de microencapsulação de  $\beta$ -galactosidase com diferentes polímeros como materiais de parede.

Polímeros	Fonte da enzima	Célula/enzima	Método de microencapsulação	Resultados	Referência
Aditivos anfífilicos	<i>Aspergillus oryzae</i>	Enzima	Liofilização	$\beta$ -galactosidase liofilizada na concentração de 1 mg/mL manteve cerca de 70% do seu valor inicial da atividade.	Ken-ichi et al. (1993)
Lipossomas	—	Enzima	Liofilização	Retenção relatada de 96%, 95% e 87% da atividade após 15, 30 e 60 dias, respectivamente, a 17 °C.	Kim et al. (1999)
Eudragit L-100®	<i>Aspergillus oryzae</i>	Enzima	Método de evaporação por solvente	As atividades enzimáticas relativas foram de 68% e 40% em produtos recém-preparados e estressados, respectivamente (40 °C e 75% UR).	Squillante et al.(2003).
Lipossomas	—	Enzima	Desidratação-reidratação	A 55 °C, a enzima lipossomal reteve 86% da sua atividade; no entanto, apenas 65% da atividade de $\beta$ -galactosidase livre foi observada na mesma temperatura	Rodriguez-Nogales et al. (2005)

Continua.

## Capítulo 2 – Revisão da literatura

Cont. Quadro 2.5 - Estudos de microencapsulação de  $\beta$ -galactosidase com diferentes polímeros como materiais de parede.

Polímeros	Fonte da enzima	Célula/enzima	Método de microencapsulação	Resultados	Referência
Isolado de proteína de soro de leite, maltodextrina (revestimento secundário) e goma arábica (revestimento primário)	—	Enzima	Emulsão água-óleo-água e liofilização	retenção da atividade enzimática de 5,26% com proteína de soja isolada como revestimento e 1,12% com maltodextrina como revestimento central.	Ahn et al. (2013)
Quitosana modificada (solúvel em água)	<i>Escherichia coli</i>	Enzima	Secagem por atomização	O valor relativo da enzima livre diminuiu para 92%, 78% e 67% à medida que o pH aumentou para 7,2, 7,7 e 8,0, respectivamente. A diminuição foi menor para a enzima imobilizada com 0,2 de quitosana, em pH 7,2 a atividade relativa foi de 100%.	Estevinho et al.(2013)
Goma arábica, quitosana, quitosana modificada, alginato de cálcio, alginato de sódio	<i>Escherichia coli</i>	Enzima	Secagem por atomização	A atividade foi de 37%, 20%, 20%, 13%, 0%, para goma arábica, quitosana modificada, alginato de cálcio, alginato de sódio e quitosana, respectivamente, quando comparada com a atividade da enzima livre (955U)	Estevinho et al (2014a)

Continua.

Capítulo 2 – Revisão da literatura

Cont. Quadro 2.5 - Estudos de microencapsulação de  $\beta$ -galactosidase com diferentes polímeros como materiais de parede.

Polímeros	Fonte da enzima	Célula/enzima	Método de microencapsulação	Resultados	Referência
Quitosana modificada (solúvel em água)	<i>Escherichia coli</i>	Enzima	Secagem por atomização	A atividade foi de 525U em pH 6, o que representa 55% da atividade da enzima livre.	Estevinho et al (2015)
Triglicerídeo de cadeia média (revestimento primário); ftalato de hidroxipropilmetil celulose (HPMCP) e goma-laca (revestimento entérico secundário)	<i>Kluyveromyces lactis</i>	Enzima	Emulsificação e liofilização	As meias-vidas de pós de lactase microencapsulados revestidos com HPMCP e goma-laca foram 27,95 e 12,25 meses a 4 °C, e 5,31 e 2,59 meses a 25 °C, respectivamente.	Ahn et al. (2018)

Continua.

Cont. Quadro 2.5. - Estudos de microencapsulação de  $\beta$ -galactosidase com diferentes polímeros como materiais de parede.

Polímeros	Fonte da enzima	Célula/enzima	Método de microencapsulação	Resultados	Referência
Gelatina, goma arábica	<i>Kluyveromyces lactis</i> ; <i>Aspergillus oryzae</i>	Enzima	Emulsão água-óleo-água e coacervação complexa	Após 120 dias, a enzima livre reteve cerca de 37% ( <i>K. lactis</i> ) e 18% ( <i>A. oryzae</i> ) de sua atividade catalítica. Já a enzima microencapsulada manteve mais de 95% e 64% da sua atividade nas mesmas condições, respectivamente.	Souza et al. (2019a)
Sílica	<i>Streptococcus lactis</i>	Célula	Secagem por atomização	A atividade mais alta foi observada a uma temperatura de entrada de 90 °C (101,5 U), e a mais baixa foi a 160 °C (2,07 U).	Mukundan (2020)

## 2.7 ESTABILIDADE DA B-GALACTOSIDASE IMOBILIZADA

A estabilidade enzimática deve ser interpretada em dois conceitos diferentes, um é a estabilidade intrínseca da enzima e o outro é a estabilidade operacional da enzima. Por definição, a estabilidade intrínseca representa a estabilidade das próprias moléculas da enzima. Na maioria dos artigos, apenas a estabilidade operacional é avaliada (KIM et al., 2006). Em contrapartida, estabilidade operacional significa a persistência da atividade da enzima durante um processo, ou seja, nas condições de uso. Temperatura e pH são fatores limitantes na estabilidade de uma enzima, incluindo a  $\beta$ -galactosidase, durante sua aplicação nas indústrias (BENIWAL et al., 2018).

Rodríguez-Nogales et al. (2005) avaliaram a estabilidade térmica da enzima  $\beta$ -galactosidase microencapsulada em lipossomas variando de 30 °C a 90 °C. A 55 °C, a enzima microencapsulada reteve 86% de sua atividade; no entanto, apenas 65% da atividade da  $\beta$ -galactosidase na forma livre foi observada na mesma temperatura. Neste estudo, verificou-se que a microencapsulação proporcionou maior estabilidade térmica do que a enzima em sua forma livre.

Além disso, Souza et al. (2019a) avaliaram a estabilidade térmica da enzima  $\beta$ -galactosidase microencapsulada em gelatina e goma arábica entre 30 °C e 80 °C; verificou-se que a atividade da enzima microencapsulada, acima de 37 °C, diminuiu a uma taxa mais lenta do que a livre e não apresentou atividade acima de 55 °C para a enzima livre. O efeito do pH e do tempo de armazenamento na retenção da atividade da lactase livre e encapsulada também foram avaliados; em pH 2,0 a pH 7,0, enzimas livres apresentaram menor atividade, enquanto enzimas encapsuladas não sofreram os efeitos negativos da mudança de pH. A estabilidade de armazenamento da enzima livre após 120 dias foi de cerca de 37% e 18%, enquanto a estabilidade da enzima microencapsulada foi de 64% e 95% da atividade inicial para  $\beta$ -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* e *Aspergillus oryzae*, respectivamente. Os autores fizeram uma observação importante, a estabilidade de estocagem foi melhor no armazenamento a longo prazo, enquanto durante os primeiros dez dias, a atividade da enzima encapsulada diminuiu sincronicamente com a enzima livre.

Argenta et al. (2021) avaliaram que a imobilização em alginato de cálcio conferiu maior estabilidade à enzima  $\beta$ -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* imobilizada em relação à sua forma livre. Após a imobilização submeteram a enzima em solução com pH 5,0 juntamente

com o controle (livre), e verificaram que a enzima imobilizada manteve sua atividade até 61%, em comparação, a enzima livre que teve uma atividade de apenas 35% em relação à atividade inicial (100%), isto é, antes de submeterem ao pH 5,0. Além disso, após duas horas da reação de hidrólise, a enzima  $\beta$ -galactosidase livre apresentou apenas 50% da atividade em relação à atividade inicial a 40 °C, enquanto a enzima imobilizada manteve sua atividade em 95 e 85%, para os testes em 40 °C e 60 °C, respectivamente. Em outro estudo, Souza et al. (2019b) observaram que a  $\beta$ -galactosidase livre e imobilizada por complexação com alginato, como resultado, apresentou estabilidade operacional indiferente em temperaturas de até 55 °C e pH 6. No entanto, em temperaturas acima de 60 °C, a atividade da enzima livre reduziu significativamente em comparação ao biocatalizador imobilizado. Essa atividade reduzida em altas temperaturas para as enzimas pode ser explicada pelo seu estado inativo ou desnaturado devido à alta temperatura, a modificações da estrutura tridimensional da enzima, seguida pela interrupção do acesso do substrato ao sítio ativo. Nenhuma atividade foi observada até pH 5,0 para a enzima imobilizada por complexação a 55 °C devido à inativação enzimática nessa temperatura. No entanto, acima de pH 5, com o início da dissociação do complexo, a atividade da enzima aumentou e foi semelhante à da enzima livre em pH 7,0.

Shafi et al. (2021) avaliaram o efeito do pH na atividade da  $\beta$ -galactosidase solúvel e imobilizada em nanocompósito de óxido de grafeno. Observou-se que a atividade máxima exibida pela enzima  $\beta$ -galactosidase solúvel foi em pH 4,5, enquanto a enzima imobilizada foi estável em pH 4,5 a 7, retendo cerca de 90% de sua atividade a 37 °C em 15 minutos. Ricardi et al. (2021) observaram que em valores de pH acima de 6,5, o biocatalisador imobilizado em material mesoporoso de sílica/titânia/quitosana apresentou atividade ligeiramente superior à da enzima livre, mantendo a atividade em  $45 \pm 1\%$  em pH 8,0, enquanto a forma livre foi retida cerca de  $30 \pm 3\%$ .

Haghju et al. (2018) estudaram a enzima  $\beta$ -galactosidase imobilizada em nanofibras, durante 28 dias de armazenamento a 4 °C e 25 °C, que reteve 77% e 42% de sua atividade inicial, respectivamente.

Wolf et al. (2021) relataram que a temperatura de reação para hidrolisar lactose usando a enzima produzida a partir de *Kluyveromyces lactis* livre e imobilizada em hidrogel à base de goma arábica e à base de quitosana, pode ser ajustada em  $37,0^\circ\text{C} \pm 1,0^\circ\text{C}$  ou  $25,0^\circ\text{C} \pm 1,0^\circ\text{C}$ , enquanto o melhor valor de pH foi definido em 7,5. Nessas condições, as enzimas podem ser úteis na indústria alimentícia. Ricardi et al. (RICARDI et al., 2021) observaram que após 24h

de incubação a 40 °C, a lactase imobilizada em material mesoporoso de sílica/titânia reteve  $40 \pm 4$  % da atividade inicial, enquanto a enzima livre reteve apenas  $20 \pm 5$  % da atividade inicial.

## 2.8 REFERÊNCIAS

AHN, Sung Il; KWAK, Hae Soo; AL MIJAN, Mohammad; JHOO, Jin Woo; KIM, Gur Yoo; RA, Chang Six. Shelf-life prediction of microencapsulated B-galactosidase powder prepared using enteric double-coating technology. **Journal of Food Process Engineering**, [S. l.], v. 41, n. 3, 2018. DOI: 10.1111/JFPE.12664.

AHN, Sung Il; LEE, Yun Kyung; KWAK, Hae Soo. **Optimization of water-in-oil-in-water microencapsulated  $\beta$ -galactosidase by response surface methodology**. <http://dx.doi.org/10.3109/02652048.2012.752534>, [S. l.], v. 30, n. 5, p. 460–469, 2013. DOI: 10.3109/02652048.2012.752534.

ALBUQUERQUE, Tiago Lima De; DE SOUSA, Marylane; GOMES E SILVA, Natan Câmara; GIRÃO NETO, Carlos Alberto Chaves; GONÇALVES, Luciana Rocha Barros; FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto; ROCHA, Maria Valderez Ponte.  $\beta$ -Galactosidase from *Kluyveromyces lactis*: Characterization, production, immobilization and applications - A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 191, p. 881–898, 2021. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2021.09.133.

ALBUQUERQUE, Tiago Lima De; GOMES, Sandy Danielle Lucindo; D'ALMEIDA, Alan Portal; FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto; GONÇALVES, Luciana Rocha Barros; ROCHA, Maria Valderez Ponte. Immobilization of  $\beta$ -galactosidase in glutaraldehyde-chitosan and its application to the synthesis of lactulose using cheese whey as feedstock. **Process Biochemistry**, [S. l.], v. 73, p. 65–73, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.08.010>.

AMERI, Mahmoud; MAA, Yuh-Fun. Spray Drying of Biopharmaceuticals: Stability and Process Considerations. **Drying Technology**, [S. l.], v. 24, n. 6, p. 763–768, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1080/03602550600685275>.

ANEKELLA, Kartheek; ORSAT, Valérie. Optimization of microencapsulation of probiotics in raspberry juice by spray drying. **LWT - Food Science and Technology**, [S. l.], v. 50, n. 1, p. 17–24, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2012.08.003>.

ARANAZ, Inmaculada; MENGIBAR, Marian; HARRIS, Ruth; PANOS, Ines; MIRALLES, Beatriz; ACOSTA, Niuris; GALED, Gemma; HERAS, Angeles. Functional Characterization of Chitin and Chitosan. **Current Chemical Biology**, [S. l.], v. 3, n. 2, p. 203–230, 2009. DOI: <https://doi.org/10.2174/2212796810903020203>.

ARGENTA, Aline B.; NOGUEIRA, Alessandro; SCHEER, Agnes de P. Hydrolysis of whey lactose: *Kluyveromyces lactis*  $\beta$ -galactosidase immobilisation and integrated process hydrolysis-ultrafiltration. **International Dairy Journal**, [S. l.], v. 117, p. 105007, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2021.105007>.

ARSALAN, Abdullah; ALAM, Md Fazle; FARHEEN ZOFAIR, Syeda Fauzia; AHMAD, Sumbul; YOUNUS, Hina. Immobilization of  $\beta$ -galactosidase on tannic acid stabilized silver nanoparticles: A safer way towards its industrial application. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, [S. l.], v. 226, p. 117637, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.saa.2019.117637>.

BAJPAI, Pratima. Application of Enzymes in the Pulp and Paper Industry. **Biotechnology Progress**, [S. l.], v. 15, n. 2, p. 147–157, 1999. DOI: 10.1021/BP990013K.

BASSO, Alessandra; SERBAN, Simona. Industrial applications of immobilized enzymes—A review. **Molecular Catalysis**, [S. l.], v. 479, p. 110607, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mcat.2019.110607>.

BEDFORD, Michael R. The evolution and application of enzymes in the animal feed industry: the role of data interpretation. **British Poultry Science**, [S. l.], v. 59, n. 5, p. 486–493, 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/00071668.2018.1484074>.

BENIWAL, Arun; SAINI, Priyanka; KOKKILIGADDA, Anusha; VIJ, Shilpa. Use of silicon dioxide nanoparticles for  $\beta$ -galactosidase immobilization and modulated ethanol production by co-immobilized *K. marxianus* and *S. cerevisiae* in deproteinized cheese whey. **LWT**, [S. l.], v. 87, p. 553–561, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.09.028>.

BERTONI, Serena; ALBERTINI, Beatrice; DOLCI, Luisa Stella; PASSERINI, Nadia. Spray congealed lipid microparticles for the local delivery of  $\beta$ -galactosidase to the small intestine. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, [S. l.], v. 132, p. 1–10, 2018. DOI: [10.1016/J.EJPB.2018.08.014](https://doi.org/10.1016/J.EJPB.2018.08.014).

BOBBIO, Florinda Orsati; BOBBIO, Paulo. A. Introdução à química de alimentos. 3 edição ed. São Paulo: **Livraria Varela**, 2003.

BOUCHOUCHA, Michel; FYSEKIDIS, Marinos; ROMPTEAUX, Pierre; RAYNAUD, Jean-Jacques; SABATE, Jean-Marc; BENAMOUGIZ, Robert. Lactose Sensitivity and Lactose Malabsorption: The 2 Faces of Lactose Intolerance. **Journal of Neurogastroenterology and Motility**, [S. l.], v. 27, n. 2, p. 257–264, 2021. DOI: <https://doi.org/10.5056/jnm20094>.

BUCKLEY, James A. Quantifying the antiestrogen activity of wastewater treatment plant effluent using the yeast estrogen screen. **Environmental Toxicology and Chemistry**, [S. l.], v. 29, n. 1, p. 73–78, 2010. DOI: [10.1002/ETC.11](https://doi.org/10.1002/ETC.11).

BURGOS, M. Ines; OCHOA, Aylen; PERILLO, María A.  $\beta$ -sheet to  $\alpha$ -helix conversion and thermal stability of  $\beta$ -Galactosidase encapsulated in a nanoporous silica gel. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [S. l.], v. 508, n. 1, p. 270–274, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.11.077>.

CARDOSO, Beatriz B.; SILVÉRIO, Sara C.; ABRUNHOSA, Luís; TEIXEIRA, José A.; RODRIGUES, Lígia R.  $\beta$ -galactosidase from *Aspergillus laticoffeatus*: A promising biocatalyst for the synthesis of novel prebiotics. **International Journal of Food Microbiology**, [S. l.], v. 257, p. 67–74, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.06.013>.

CAREVIC, Milica; VUKASINOVIC-SEKULIC, Maja; GRBAVIC, Sanja; STOJANOVIC, Marija; MIHAILOVIC, Mladen; DIMITRIJEVIC, Aleksandra; BEZBRADICA, Dejan. Optimization of  $\beta$ -galactosidase production from lactic acid bacteria. **Hemijaska industrija**, [S. l.], v. 69, n. 3, p. 305–312, 2015. DOI: <https://doi.org/10.2298/HEMIND140303044C>.

CARGNIN, Mariana Aguiar; GASPARIN, Bruna Carla; PAULINO, Alexandre Tadeu. Hydrolysis of lactose using  $\beta$ -D-galactosidase immobilized in pectin-based hydrogels: Modeling and optimization by factorial design. **LWT**, [S. l.], v. 132, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109836>.

CARGNIN, Mariana Aguiar; SOUZA, Alana Gabrieli d; LIMA, Giovanni Floriano De; GASPARIN, Bruna Carla; ROSA, Derval dos Santos; PAULINO, Alexandre Tadeu. Pinus residue/pectin-based composite hydrogels for the immobilization of  $\beta$ -D-galactosidase. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 149, p. 773–782, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.01.280>.

CARNEIRO, Helena C. F.; TONON, Renata V.; GROSSO, Carlos R. F.; HUBINGER, Míriam D. Encapsulation efficiency and oxidative stability of flaxseed oil microencapsulated by spray drying using different combinations of wall materials. **Journal of Food Engineering**, [S. l.], v. 115, n. 4, p. 443–451, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2012.03.033>.

CATANZARO, Roberto; SCIUTO, Morena; MAROTTA, Francesco. Lactose intolerance: An update on its pathogenesis, diagnosis, and treatment. **Nutrition Research**, [S. l.], v. 89, p. 23–34, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2021.02.003>.

CHEN, Jian; WANG, Qiang; HUA, Zhaozhe; DU, Guocheng. Research and application of biotechnology in textile industries in China. **Enzyme and Microbial Technology**, [S. l.], v. 40, n. 7, p. 1651–1655, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2006.07.040>.

DALMEIDA, A. P.; SILVA, L. H. A.; SILVA, N. C. G.; ALBUQUERQUE, T. L.; GONÇALVES, L. R. B.; ROCHA, M. V. P. Síntese enzimática de lactulose por  $\beta$ -galactosidase utilizando frutose do suco de caju com um substrato alternativo. In: 2018, **Anais [...]**. [s.l: s.n.] DOI: 10.5151/cobeq2018-pt.0521.

DALTIN, Décio. TENSÓATIVOS: QUÍMICA, PROPRIEDADES E APLICAÇÕES. 1. ed. São Paulo: **Bluncher**, 2011.

DAMIN, B. I. S.; KOVALSKI, F. C.; FISCHER, J.; PICCIN, J. S.; DETTMER, A. Challenges and perspectives of the  $\beta$ -galactosidase enzyme. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [S. l.], v. 105, n. 13, p. 5281–5298, 2021. DOI: 10.1007/s00253-021-11423-7.

DATTA, Sumitra; CHRISTENA, L. Rene; RAJARAM, Yamuna Rani Sriramulu. Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. 3 **Biotech**, [S. l.], v. 3, n. 1, p. 1–9, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13205-012-0071-7>.

DEMUNER, Braz J.; PEREIRA JUNIOR, Nei; ANTUNES, Adelaide M. S. Technology Prospecting on Enzymes for the Pulp and Paper Industry. **Journal of technology management & innovation**, [S. l.], v. 6, n. 3, p. 148–158, 2011. DOI: <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-27242011000300011>.

DESAI, K. G. H.; PARK, H. J. Preparation of cross-linked chitosan microspheres by spray drying: Effect of cross-linking agent on the properties of spray dried microspheres. **Journal of Microencapsulation**, [S. l.], v. 22, n. 4, p. 377–395, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1080/02652040500100139>.

DEWIASTY, Esthika; SETIATI, Siti; AGUSTINA, Rina; ROOSHEROE, Arya Govinda; ABDULLAH, Murdani; INSTANTI, Rahmi; DE GROOT, Lisette CPGM. Prevalence of lactose intolerance and nutrients intake in an older population regarded as lactase non-persistent. **Clinical Nutrition ESPEN**, [S. l.], v. 43, p. 317–321, 2021. DOI: 10.1016/J.CLNESP.2021.03.033.

DOMÍNGUEZ-JIMÉNEZ, José Luís; FERNÁNDEZ-SUÁREZ, Antonio. Diagnosis of lactose intolerance. **Medicina Clínica (English Edition)**, [S. l.], v. 148, n. 6, p. 262–264, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.medcle.2016.11.039>.

EL-SALAM, Baraka A. Abd; IBRAHIM, Osama A.; AMER, Abeer E. Efficient enzymatic conversion of lactose in milk using fungal  $\beta$ -galactosidase. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, [S. l.], v. 29, p. 101813, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101813>.

ESKANDARLOO, Hamed; ABBASPOURRAD, Alireza. Production of galacto-oligosaccharides from whey permeate using  $\beta$ -galactosidase immobilized on functionalized glass beads. **Food Chemistry**, [S. l.], v. 251, p. 115–124, 2018. DOI: 10.1016/J.FOODCHEM.2018.01.068.

ESTEVINHO, Berta Maria Abreu Nogueiro; ROCHA, Fernando Alberto Nogueira; SANTOS, Lúcia Maria Da Silveira; ALVES, Maria Arminda Costa. Using water-soluble chitosan for flavour microencapsulation in food industry. **Journal of Microencapsulation**, [S. l.], v. 30, n. 6, p. 571–579, 2013. DOI: <https://doi.org/10.3109/02652048.2013.764939>.

ESTEVINHO, Berta N.; DAMAS, Ana M.; MARTINS, Pedro; ROCHA, Fernando. Microencapsulation of  $\beta$ -galactosidase with different biopolymers by a spray-drying process.

**Food Research International**, [S. l.], v. 64, p. 134–140, 2014. a. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2014.05.057>.

ESTEVINHO, Berta N.; DAMAS, Ana M.; MARTINS, Pedro; ROCHA, Fernando. The Influence of Microencapsulation with a Modified Chitosan (Water Soluble) on  $\beta$ -Galactosidase Activity. **Drying Technology**, [S. l.], v. 32, n. 13, p. 1575–1586, 2014. b. DOI: <https://doi.org/10.1080/07373937.2014.909843>.

ESTEVINHO, Berta N.; RAMOS, Irena; ROCHA, Fernando. Effect of the pH in the formation of  $\beta$ -galactosidase microparticles produced by a spray-drying process. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 78, p. 238–242, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.03.049>.

EUROSTAT. **Production and use of milk (million tonnes, EU)**. 2020.

FACIN, Bruno R.; MORET, Bruna; BARETTA, Dilmar; BELFIORE, Laurence A.; PAULINO, Alexandre T. Immobilization and controlled release of  $\beta$ -galactosidase from chitosan-grafted hydrogels. **Food Chemistry**, [S. l.], v. 179, p. 44–51, 2015. DOI: <tp://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.01.088>.

FACIONI, Maria Sole; RASPINI, Benedetta; PIVARI, Francesca; DOGLIOTTI, Elena; CENA, Hellas. Nutritional management of lactose intolerance: the importance of diet and food labelling. **Journal of Translational Medicine**, [S. l.], v. 18, n. 1, p. 1–9, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12967-020-02429-2>.

FANG, Zhen; YONG, Yang Chun; ZHANG, Juan; DU, Guocheng; CHEN, Jian. Keratinolytic protease: a green biocatalyst for leather industry. **Applied Microbiology and Biotechnology** 2017 101:21, [S. l.], v. 101, n. 21, p. 7771–7779, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8484-1>.

FARA, Agustina; SABATER, Carlos; PALACIOS, Jorge; REQUENA, Teresa; MONTILLA, Antonia; ZÁRATE, Gabriela. Prebiotic galactooligosaccharides production from lactose and lactulose by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CRL450. **Food & Function**, [S. l.], v. 11, n. 7, p. 5875–5886, 2020. DOI: [10.1039/D0FO00942C](https://doi.org/10.1039/D0FO00942C).

FASIM, Aneesa; MORE, Veena S.; MORE, Sunil S. Large-scale production of enzymes for biotechnology uses. **Current Opinion in Biotechnology**, [S. l.], v. 69, p. 68–76, 2021. DOI: [10.1016/J.COPBIO.2020.12.002](https://doi.org/10.1016/J.COPBIO.2020.12.002).

FERNANDES, Luciana P.; CANDIDO, Regina C.; OLIVEIRA, Wanderley P. Spray drying microencapsulation of *Lippia sidoides* extracts in carbohydrate blends. **Food and Bioproducts Processing**, [S. l.], v. 90, n. 3, p. 425–432, 2012. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fbp.2011.12.001>.

FOGLIANO, Rosana Rodrigues Figueira; BOHOMOL, Elena; SCHVEITZER, Mariana Cabral; COCA, Kelly Pereira; ABRÃO, Ana Cristina Freitas de Vilhena. Quality management in Human Milk Banks: a scope review. **Revista Brasileira de Enfermagem**, [S. l.], v. 73, n. suppl 6, 2020. DOI: [10.1590/0034-7167-2019-0640](https://doi.org/10.1590/0034-7167-2019-0640).

FOOD INGREDIENTS BRASIL. **As gomas exudadas de plantas**. [S. l.], n. 17, p. 26–46, 2011.

FOTOUH, Deyaa M. Abol; BAYOUMI, Reda A.; HASSAN, Mohamed A. Production of Thermoalkaliphilic Lipase from *Geobacillus thermoleovorans* DA2 and Application in Leather Industry. **Enzyme Research**, [S. l.], v. 2016, p. 1–9, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1155/2016/9034364>.

FOUDAZI, Reza; QAVI, Sahar; MASALOVA, Irina; MALKIN, Alexander Ya. Physical chemistry of highly concentrated emulsions. **Advances in Colloid and Interface Science**, [S. l.], v. 220, p. 78–91, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cis.2015.03.002>.

FRANZOL, Angélica; REZENDE, Mirabel Cerqueira. Estabilidade de emulsões: um estudo de caso envolvendo emulsionantes aniônico, catiônico e não-iônico. **Polímeros**, [S. l.], v. 25, p. 1–9, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1590/0104-1428.1669>.

FREITAS, Andressa Barella De; ENDRES, Creciana Maria; MARTINI, Daiane; DAL CASTEL, Andréia Paula. Ação dos crioprotetores glicose, trealose e quitosana na manutenção da viabilidade de células de *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* após liofilização. **Ciência Animal Brasileira**, [S. l.], v. 21, 2020. DOI: [10.1590/1809-6891V21E-47464](https://doi.org/10.1590/1809-6891V21E-47464).

GÄNZLE, Michael G.; HAASE, Gottfried; JELEN, Paul. Lactose: Crystallization, hydrolysis and value-added derivatives. **International Dairy Journal**, [S. l.], v. 18, n. 7, p. 685–694, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2008.03.003>.

GARCIA-GALAN, Cristina; BERENGUER-MURCIA, Á.; FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto; RODRIGUES, Rafael C. Potential of Different Enzyme Immobilization Strategies to Improve Enzyme Performance. **Advanced Synthesis & Catalysis**, [S. l.], v. 353, n. 16, p. 2885–2904, 2011. DOI: [10.1002/ADSC.201100534](https://doi.org/10.1002/ADSC.201100534).

GENNARI, Adriano; SIMON, Renate; ANDRADE, Bruna Coelho De; SARAIVA MACEDO TIMMERS, Luís Fernando; MILANI MARTINS, Vera Lúcia; RENARD, Gaby; CHIES, Joceli Maria; VOLPATO, Giandra; VOLKEN DE SOUZA, Cláudia Fernanda. Production of beta-galactosidase fused to a cellulose-binding domain for application in sustainable industrial processes. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 326, p. 124747, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.124747>.

GHARSALLAOUI, Adem; ROUDAUT, Gaëlle; CHAMBIN, Odile; VOILLEY, Andrée; SAUREL, Rémi. Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. **Food Research International**, [S. l.], v. 40, n. 9, p. 1107–1121, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2007.07.004>.

GLICKSMAN, Martin. Utilization of seaweed hydrocolloids in the food industry. **Hydrobiologia**, [S. l.], v. 151–152, n. 1, p. 31–47, 1987. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00046103>.

GOH, Cheong Hian; HENG, Paul Wan Sia; CHAN, Lai Wah. Alginates as a useful natural polymer for microencapsulation and therapeutic applications. **Carbohydrate Polymers**, [S. l.], v. 88, n. 1, p. 1–12, 2012. DOI: <https://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.11.012>.

GUERRERO, Cecilia; VERA, Carlos; ARAYA, Erick; CONEJEROS, Raúl; ILLANES, Andrés. Repeated-batch operation for the synthesis of lactulose with  $\beta$ -galactosidase immobilized by aggregation and crosslinking. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 190, p. 122–131, 2015. DOI: <https://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2015.04.039>.

GUIDINI, Carla Zanella; FISCHER, Janaína; RESENDE, Miriam Maria De; CARDOSO, Vicelma Luiz; RIBEIRO, Eloízio Júlio.  $\beta$ -Galactosidase of *Aspergillus oryzae* immobilized in an ion exchange resin combining the ionic-binding and crosslinking methods: Kinetics and stability during the hydrolysis of lactose. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, [S. l.], v. 71, n. 3–4, p. 139–145, 2011. DOI: <https://dx.doi.org/10.1016/j.molcatb.2011.04.010>.

GUO, Zheng; XU, Xuebing. New opportunity for enzymatic modification of fats and oils with industrial potentials. **Organic & Biomolecular Chemistry**, [S. l.], v. 3, n. 14, p. 2615, 2005. DOI: <http://xlink.rsc.org/?DOI=b506763d>.

GÜRDAŞ, Sevim; GÜLEÇ, H. Ali; MUTLU, Mehmet. Immobilization of *Aspergillus oryzae*  $\beta$ -Galactosidase onto Duolite A568 Resin via Simple Adsorption Mechanism. **J Food and Bioprocess Technology**, [S. l.], v. 5, n. 3, p. 904–911, 2012. DOI: [10.1007/S11947-010-0384-7](https://doi.org/10.1007/S11947-010-0384-7).

HACKENHAAR, Camila Regina; SPOLIDORO, Luiza Strapasson; FLORES, Eli Emanuel Esparza; KLEIN, Manuela Poletto; HERTZ, Plinho Francisco. Batch synthesis of galactooligosaccharides from co-products of milk processing using immobilized  $\beta$ -galactosidase from *Bacillus circulans*. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, [S. l.], v. 36, p. 102136, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2021.102136>.

HAGHJU, Sara; BARI, Mahmoud Rezazadeh; KHALED-ABAD, Mohammad Alizadeh. Affecting parameters on fabrication of  $\beta$ -D-galactosidase immobilized chitosan/poly (vinyl alcohol) electrospun nanofibers. **Carbohydrate Polymers**, [S. l.], v. 200, p. 137–143, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.07.096>.

HAIDER, Toshiba; HUSAIN, Qayyum. Hydrolysis of milk/whey lactose by  $\beta$  galactosidase: A comparative study of stirred batch process and packed bed reactor prepared with calcium alginate entrapped enzyme. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, [S. l.], v. 48, n. 1, p. 576–580, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cep.2008.02.007>.

HAMER, R. J. Enzymes in the baking industry. In: TUCKER, G. A.; WOODS, L. F. J. (org.). **Enzymes in Food Processing**. 2. ed. Boston, MA: Springer US, 1995. p. 190–222. DOI: [http://link.springer.com/10.1007/978-1-4615-2147-1\\_6](http://link.springer.com/10.1007/978-1-4615-2147-1_6).

HANAUER, Duana Ceciliane; SOUZA, Alana Gabrieli De; CARGNIN, Mariana Aguiar; GASPARIN, Bruna Carla; ROSA, Derval dos Santos; PAULINO, Alexandre Tadeu. Pectin-based biohydrogels reinforced with eucalyptus sawdust: Synthesis, characterization,  $\beta$ -D-Galactosidase immobilization and activity. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, [S. l.], v. 97, p. 368–382, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2021.02.022>.

HUSAIN, Qayyum; ANSARI, Shakeel Ahmed; ALAM, Fahad; AZAM, Ameer. Immobilization of *Aspergillus oryzae*  $\beta$  galactosidase on zinc oxide nanoparticles via simple adsorption mechanism. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 49, n. 1, p. 37–43, 2011. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2011.03.011>.

JAMES, Jennylynd; SIMPSON, Benjamin K.; MARSHALL, Maurice R. **Application of enzymes in food processing**. <http://dx.doi.org/10.1080/10408399609527735>, [S. l.], v. 36, n. 5, p. 437–463, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1080/10408399609527735>.

JANSSON-KNODELL, Claire L.; KRAJICEK, Edward J.; SAVAIANO, Dennis A.; SHIN, Andrea S. Lactose Intolerance. **Mayo Clinic Proceedings**, [S. l.], v. 95, n. 7, p. 1499–1505, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2020.04.036>.

JI, Dawei; SIMS, Ian; XU, Min; STEWART, Ian; AGYEI, Dominic. Production and identification of galacto-oligosaccharides from lactose using  $\beta$ -D-galactosidases from *Lactobacillus leichmannii* 313. **Carbohydrate Polymer Technologies and Applications**, [S. l.], v. 2, p. 100038, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carpta.2021.100038>.

JIN, Weiping; WANG, Zhifeng; PENG, Dengfeng; SHEN, Wangyang; ZHU, Zhenzhou; CHENG, Shuiyuan; LI, Bin; HUANG, Qingrong. Effect of linear charge density of polysaccharides on interactions with  $\alpha$ -amylase: Self-Assembling behavior and application in enzyme immobilization. **Food Chemistry**, [S. l.], v. 331, p. 127320, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127320>.

JUJUN, Onladda; NGUYEN, Thu-Ha; MAISCHBERGER, Thomas; IQBAL, Sanaullah; HALTRICH, Dietmar; YAMABHAI, Montarop. Cloning, purification, and characterization of  $\beta$ -galactosidase from *Bacillus licheniformis* DSM 13. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [S. l.], v. 89, n. 3, p. 645–654, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2862-2>.

KANTH, Neel; NEEL, Sejal; SANTOSH, Ramchandani; ABBASI, Zainab. Prevalence of Lactose Intolerance and its Association with Malnutrition in Children. **National Journal of Health Sciences**, [S. l.], v. 4, p. 103–109, 2019. DOI: 10.21089/njhs.43.0103.

KARACA, Asli Can; NICKERSON, Michael; LOW, Nicholas H. Microcapsule production employing chickpea or lentil protein isolates and maltodextrin: Physicochemical properties and oxidative protection of encapsulated flaxseed oil. **Food Chemistry**, [S. l.], v. 139, n. 1–4, p. 448–457, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.01.040>.

KAZENWADEL, F.; WAGNER, H.; RAPP, B. E.; FRANZREB, M. Optimization of enzyme immobilization on magnetic microparticles using 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDC) as a crosslinking agent. **Analytical Methods**, [S. l.], v. 7, n. 24, p. 10291–10298, 2015. DOI: 10.1039/C5AY02670A.

KEN-ICHI, Izutsu; SUMIE, Yoshioka; TADAO, Terao. Stabilization of  $\beta$ -galactosidase by amphiphilic additives during freeze-drying. **International Journal of Pharmaceutics**, [S. l.], v. 90, n. 3, p. 187–194, 1993. DOI: [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(93\)90190-Q](https://doi.org/10.1016/0378-5173(93)90190-Q).

KHANNA, Omaditya; MOYA, Monica L.; OPARA, Emmanuel C.; BREY, Eric M. Synthesis of multilayered alginate microcapsules for the sustained release of fibroblast growth factor-1. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, [S. l.], v. 95A, n. 2, p. 632–640, 2010. DOI: 10.1002/JBM.A.32883.

KIM, Chong Kook; CHUNG, Hey Soon; LEE, Mi Kyung; CHOI, Lee Na; KIM, Moon Hee. Development of dried liposomes containing  $\beta$ -galactosidase for the digestion of lactose in milk. **International Journal of Pharmaceutics**, [S. l.], v. 183, n. 2, p. 185–193, 1999. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(99\)00115-5](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(99)00115-5).

KIM, Moon Il; KIM, Jungbae; LEE, Jinwoo; SHIN, Sujeong; NA, Hyon Bin; HYEON, Taeghwan; PARK, Hyun Gyu; CHANG, Ho Nam. One-dimensional crosslinked enzyme aggregates in SBA-15: Superior catalytic behavior to conventional enzyme immobilization. **Microporous and Mesoporous Materials**, [S. l.], v. 111, n. 1–3, p. 18–23, 2008. DOI: 10.1016/J.MICROMESO.2007.07.009.

KIM, Ji Hyun; PARK, Saerom; KIM, Hyungsup; KIM, Hyung Joo; YANG, Yung-Hun; KIM, Yong Hwan; JUNG, Sang-Kyu; KAN, Eunsung; LEE, Sang Hyun. Alginate/bacterial cellulose nanocomposite beads prepared using *Gluconacetobacter xylinus* and their application in lipase immobilization. **Carbohydrate Polymers**, [S. l.], v. 157, p. 137–145, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.09.074>.

KIM, Jungbae; GRATE, Jay W.; WANG, Ping. Nanostructures for enzyme stabilization. **Chemical Engineering Science**, [S. l.], v. 61, n. 3, p. 1017–1026, 2006. DOI: 10.1016/j.ces.2005.05.067.

KIM, Nam-chul; JEON, Byung-ju; AHN, Joungjwa; KWAK, Hae-soo. In Vitro Study of Microencapsulated Isoflavone and  $\beta$ -Galactosidase. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [S. l.], v. 54, n. 7, p. 2582–2586, 2006. DOI: 10.1021/JF052369J.

KIM, Tae-Hee; JIANG, Hu-Lin; JERE, Dhananjay; PARK, In-Kyu; CHO, Myung-Haing; NAH, Jae-Woon; CHOI, Yun-Jaie; AKAIKE, Toshihiro; CHO, Chong-Su. Chemical modification of chitosan as a gene carrier in vitro and in vivo. **Progress in Polymer Science**, [S. l.], v. 32, n. 7, p. 726–753, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2007.05.001>.

KIRK, Ole; BORCHERT, Torben Vedel; FUGLSANG, Claus Crone. Industrial enzyme applications. **Current Opinion in Biotechnology**, [S. l.], v. 13, n. 4, p. 345–351, 2002. DOI: 10.1016/S0958-1669(02)00328-2.

KLEIN, Manuela P.; HACKENHAAR, Camila R.; LORENZONI, André S. G.; RODRIGUES, Rafael C.; COSTA, Tania M. H.; NINOW, Jorge L.; HERTZ, Plinho F. Chitosan crosslinked with genipin as support matrix for application in food process: Support

characterization and  $\beta$ -d-galactosidase immobilization. **Carbohydrate Polymers**, [S. l.], v. 137, p. 184–190, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.10.069>.

KLEWICKI, Robert. Formation of gal-sorbitol during lactose hydrolysis with  $\beta$ -galactosidase. **Food Chemistry**, [S. l.], v. 100, n. 3, p. 1196–1201, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.10.064>.

KURIBAYASHI, Lilian Mayumi; DO RIO RIBEIRO, Victoria Pires; DE SANTANA, Ricardo Corrêa; RIBEIRO, Eloízio Júlio; DOS SANTOS, Milla Gabriela; FALLEIROS, Larissa Nayhara Soares Santana; GUIDINI, Carla Zanella. Immobilization of  $\beta$ -galactosidase from *Bacillus licheniformis* for application in the dairy industry. **Applied Microbiology and Biotechnology** 2021 105:9, [S. l.], v. 105, n. 9, p. 3601–3610, 2021. DOI: 10.1007/S00253-021-11325-8.

LAWTON, Marie. **Biotechnological approaches for combating food waste in the dairy industry**. [S. l.], 2021. DOI: 10.7298/92DF-MH06.

LEE, Chan Hee; LEE, Hye Sun; LEE, Jae Won; KIM, Jangyong; LEE, Jin Hyung; JIN, Eon Seon; HWANG, Ee Taek. Evaluating enzyme stabilizations in calcium carbonate: Comparing in situ and crosslinking mediated immobilization. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 175, p. 341–350, 2021. DOI: 10.1016/J.IJBIOMAC.2021.02.028.

LEONEL, Magali; CEREDA, Marney Pascoli. Caracterização físico-química de algumas tuberosas amiláceas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, [S. l.], v. 22, n. 1, p. 65–69, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0101-20612002000100012>.

LIMA, Pâmela Cristina; GAZONI, Isadora; DE CARVALHO, Alexandra Melissa Gonçalves; BRESOLIN, Daniela; CAVALHEIRO, Darlene; DE OLIVEIRA, Débora; RIGO, Elisandra.  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* in genipin-activated chitosan: An investigation on immobilization, stability, and application in diluted UHT milk. **Food Chemistry**, [S. l.], v. 349, p. 129050, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129050>.

LU, Lili; GUO, Longcheng; WANG, Ke; LIU, Yan; XIAO, Min.  $\beta$ -Galactosidases: A great tool for synthesizing galactose-containing carbohydrates. **Biotechnology Advances**, [S. l.], v. 39, p. 107465, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.107465>.

MARTARELLO, Raquel Dall'Agno; CUNHA, Luana; CARDOSO, Samuel Leite; DE FREITAS, Marcela Medeiros; SILVEIRA, Damaris; FONSECA-BAZZO, Yris Maria; HOMEM-DE-MELLO, Mauricio; FILHO, Edivaldo Ximenes Ferreira; MAGALHÃES, Pérola Oliveira. Optimization and partial purification of beta-galactosidase production by *Aspergillus niger* isolated from Brazilian soils using soybean residue. **AMB Express**, [S. l.], v. 9, n. 1, p. 81, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13568-019-0805-6>.

MARTÍNEZ VÁZQUEZ, S. E.; NOGUEIRA DE ROJAS, J. R.; REMES TROCHE, J. M.; COSS ADAME, E.; RIVAS RUÍZ, R.; USCANGA DOMÍNGUEZ, L. F. The importance of lactose intolerance in individuals with gastrointestinal symptoms. **Revista de Gastroenterología de México (English Edition)**, [S. l.], v. 85, n. 3, p. 321–331, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rgmexn.2020.03.002>.

MATEO, Cesar; PALOMO, Jose M.; FERNANDEZ-LORENTE, Gloria; GUIBAN, Jose M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme and Microbial Technology**, [S. l.], v. 40, n. 6, p. 1451–1463, 2007. DOI: 10.1016/J.ENZMICTEC.2007.01.018.

MERYAM SARDAR, Razi Ahmad. Enzyme Immobilization: An Overview on Nanoparticles as Immobilization Matrix. **Biochemistry & Analytical Biochemistry**, [S. l.], v. 04, n. 02, 2015. DOI: 10.4172/2161-1009.1000178.

MILETIĆ, Nemanja; VUKOVIĆ, Zorica; NASTASOVIĆ, Aleksandra; LOOS, Katja. Macroporous poly(glycidyl methacrylate-co-ethylene glycol dimethacrylate) resins-Versatile immobilization supports for biocatalysts. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, [S. l.], v. 56, n. 4, p. 196–201, 2009. DOI: 10.1016/j.molcatb.2008.04.012.

MISSELWITZ, Benjamin; BUTTER, Matthias; VERBEKE, Kristin; FOX, Mark R. Update on lactose malabsorption and intolerance: pathogenesis, diagnosis and clinical management. **Gut**, [S. l.], v. 68, n. 11, p. 2080–2091, 2019. DOI: <http://dx.doi.org/10.1136/gutjnl-2019-318404>.

MONTAÑEZ SOTO, José Luis. Influence of starch source in the required hydrolysis time for the production of maltodextrins with different dextrose equivalent. **African Journal of Biotechnology**, [S. l.], v. 11, n. 69, p. 13428–13435, 2012. DOI: 10.5897/ajb12.2257.

MOVAHEDPOUR, Ahmad; AHMADI, Nahid; GHALAMFARSA, Farideh; GHESMATI, Zeinab; KHALIFEH, Masoomeh; MALEKSABET, Amir; SHABANINEJAD, Zahra; TAHERI-ANGANEH, Mortaza; SAVARDASHTAKI, Amir.  $\beta$ -Galactosidase: From its source and applications to its recombinant form. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, [S. l.], v. 69, n. 2, p. 612–628, 2022. DOI: 10.1002/BAB.2137.

MUHAMMED ALSHANBERI, Asim; AHMED AL-SHAERI, Majed; AHMED ANSARI, Shakeel; VITOR FARAGO, Paulo. Overviewing the Application of  $\beta$ -Galactosidase “Immobilized on Nanoparticles” in Dairy Industries. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, [S. l.], v. 64, p. 2021, 2021. DOI: 10.1590/1678-4324-2021180747.

MUKUNDAN, Soumya; MELO, Jose Savio; SEN, Debasis; BAHADUR, Jitendra. Enhancement in  $\beta$ -galactosidase activity of *Streptococcus lactis* cells by entrapping in microcapsules comprising of correlated silica nanoparticles. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [S. l.], v. 195, n. June, p. 111245, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2020.111245>.

NAMALDI, Aysegul; ÇALIK, Pinar; ULUDAG, Yusuf. **Effects of spray drying temperature and additives on the stability of serine alkaline protease powders**. <https://doi.org/10.1080/07373930600961108>, [S. l.], v. 24, n. 11, p. 1495–1500, 2007. DOI: 10.1080/07373930600961108.

NAZZARO, Filomena; ORLANDO, Pierangelo; FRATIANNI, Florinda; COPPOLA, Raffaele. Microencapsulation in food science and biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**, [S. l.], v. 23, n. 2, p. 182–186, 2012. DOI: 10.1016/j.copbio.2011.10.001.

NEDOVIC, Viktor; KALUSEVIC, Ana; MANOJLOVIC, Verica; LEVIC, Steva; BUGARSKI, Branko. An overview of encapsulation technologies for food applications. **Procedia Food Science**, [S. l.], v. 1, p. 1806–1815, 2011. DOI: 10.1016/j.profoo.2011.09.265.

NESTERENKO, Alla; ALRIC, Isabelle; SILVESTRE, Françoise; DURRIEU, Vanessa. Vegetable proteins in microencapsulation: A review of recent interventions and their effectiveness. **Industrial Crops and Products**, [S. l.], v. 42, n. 1, p. 469–479, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.06.035>.

NETO, Carlos Alberto Chaves Girão; SILVA, Natan Câmara Gomes e.; DE OLIVEIRA COSTA, Thaís; DE ALBUQUERQUE, Tiago Lima; GONÇALVES, Luciana Rocha Barros; FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto; ROCHA, Maria Valderez Ponte. The  $\beta$ -galactosidase immobilization protocol determines its performance as catalysts in the kinetically controlled synthesis of lactulose. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 176, p. 468–478, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.02.078>.

NIVETHA, A.; MOHANASRINIVASAN, V. Mini review on role of  $\beta$ -galactosidase in lactose intolerance. **IOP Conference Series: Materials Science and Engineering**, [S. l.], v. 263, n. 2, p. 022046, 2017. DOI: 10.1088/1757-899X/263/2/022046.

NOOSHKAM, Majid; BABAZADEH, Afshin; JOOYANDEH, Hossein. Lactulose: Properties, techno-functional food applications, and food grade delivery system. **Trends in Food Science & Technology**, [S. l.], v. 80, p. 23–34, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.07.028>.

NUNES, Graciele Lorenzoni; MARQUES DA SILVA, Thaiane; TASCH HOLKEM, Augusto; DA CUNHA SCHLEY, Vitor; RAGAGNIN DE MENEZES, Cristiano. Microencapsulação de culturas probióticas: princípios do método de spray drying. **Ciência e Natura**, [S. l.], v. 37, p. 132, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.5902/2179460X19742>.

OLSEN, Hans Sejr; FALHOLT, Per. The role of enzymes in modern detergency. **Journal of Surfactants and Detergents**, [S. l.], v. 1, n. 4, p. 555–567, 1998. DOI: <http://doi.wiley.com/10.1007/s11743-998-0058-7>.

ORDÓÑEZ, Juan A.; RODRÍGUEZ, Maria Isabel Cambero; ÁLVAREZ, Lónides Fernández Álvares; SANZ, Maria Luisa Garcia; MINGUILLÓN, Gonzalo D. Garcia de Fernando; PERALES, Lorenzo de la Hoz; CONTECERO, María Dolores Selgas. **Tecnologia de Alimentos**. vol 1 ed. Porto Alegre: Artmed Editora S.A., 2005.

PANESAR, Parmjit S.; KAUR, Rupinder; SINGH, Ram S.; KENNEDY, John F. Biocatalytic strategies in the production of galacto-oligosaccharides and its global status. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 111, p. 667–679, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.01.062>.

PASSOS, Fernanda Rengel Dos; LOPES MAESTRE, Keiti; FLORÊNCIO DA SILVA, Beatriz; RODRIGUES, Angela Claudia; CONTINI TRIQUES, Carina; ALVES GARCIA, Helio; FAGUNDES-KLEN, Márcia Regina; ANTONIO DA SILVA, Edson; FIORESE, Mônica Lady. Production of a synbiotic composed of galacto-oligosaccharides and *Saccharomyces boulardii* using enzymatic-fermentative method. **Food Chemistry**, [S. l.], v. 353, p. 129486, 2021. DOI: <https://doi.org.ez15.periodicos.capes.gov.br/10.1016/j.foodchem.2021.129486>.

PATEL, Anil Kumar; SINGHANIA, Reeta Rani; PANDEY, Ashok. Novel enzymatic processes applied to the food industry. **Current Opinion in Food Science**, [S. l.], v. 7, p. 64–72, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cofs.2015.12.002>.

PATHAN, Khan; PATEL, Rohit; PAVE, Ajay; ET AL. A Review on Microencapsulation. **International Journal of Pharmaceutics Sciences**, [S. l.], v. 6, n. 2, p. 38–49, 2015.

PAWAR, Siddhesh N.; EDGAR, Kevin J. Chemical modification of alginates in organic solvent systems. **Biomacromolecules**, [S. l.], v. 12, n. 11, p. 4095–4103, 2011. DOI: [10.1021/BM201152A/SUPPL\\_FILE/BM201152A\\_SI\\_001.PDF](https://doi.org/10.1021/BM201152A/SUPPL_FILE/BM201152A_SI_001.PDF).

PEANPARKDEE, Methavee; IWAMOTO, Satoshi; YAMAUCHI, Ryo. Microencapsulation: a review of applications in the food and pharmaceutical industries. **Reviews in agricultural science**, [S. l.], v. 4, n. 0, p. 56–65, 2016. DOI: <https://doi.org/10.7831/ras.4.56>.

POLYAKOV, Nikolai E.; LESHINA, Tatyana V; KONOVALOVA, Tatyana A.; HAND, Elli O.; KISPERS, Lowell D. Inclusion complexes of carotenoids with cyclodextrins: <sup>1</sup>HNMR, EPR, and optical studies. **Free Radical Biology and Medicine**, [S. l.], v. 36, n. 7, p. 872–880, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2003.12.009>.

PORZI, Millie; BURTON-PIMENTEL, Kathryn J.; WALTHER, Barbara; VERGÈRES, Guy. Development of Personalized Nutrition: Applications in Lactose Intolerance Diagnosis and Management. **Nutrients**, [S. l.], v. 13, n. 5, p. 1503, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/nu13051503>.

POSORSKE, L. H. Industrial-scale application of enzymes to the fats and oil industry. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, [S. l.], v. 61, n. 11, p. 1758–1760, 1984. DOI: <http://doi.wiley.com/10.1007/BF02582143>.

POURMOHAMMADI, Kiana; ABEDI, Elahe. Enzymatic modifications of gluten protein: Oxidative enzymes. **Food Chemistry**, [S. l.], v. 356, p. 129679, 2021. DOI: 10.1016/J.FOODCHEM.2021.129679.

RANDALL, R. C.; PHILLIPS, G. O.; WILLIAMS, P. A. Fractionation and characterization of gum from Acacia senegal. **Food Hydrocolloids**, [S. l.], v. 3, n. 1, p. 65–75, 1989. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0268-005X\(89\)80034-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0268-005X(89)80034-7).

RATAJCZAK, Alicja Ewa; RYCHTER, Anna Maria; ZAWADA, Agnieszka; DOBROWOLSKA, Agnieszka; KRELA-KAŻMIERCZAK, Iwona. Lactose intolerance in patients with inflammatory bowel diseases and dietary management in prevention of osteoporosis. **Nutrition**, [S. l.], v. 82, p. 111043, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.nut.2020.111043>.

RAY, Sohini; RAYCHAUDHURI, Utpal; CHAKRABORTY, Runu. An overview of encapsulation of active compounds used in food products by drying technology. **Food Bioscience**, [S. l.], v. 13, p. 76–83, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fbio.2015.12.009>.

REIS, Carla Luiza Borges; SOUSA, Emerson Yvay Almeida De; SERPA, Juliana de França; OLIVEIRA, Ravena Casemiro; SANTOS, José Cleiton Sousa Dos. Design of immobilized enzyme biocatalysts: drawbacks and opportunities. **Química Nova**, [S. l.], v. 00, p. 1–16, 2019. DOI: <http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20170381>.

RIBEIRO, Eduardo Silveira; DE FARIAS, Bruna Silva; SANT'ANNA CADAVAL JUNIOR, Tito Roberto; DE ALMEIDA PINTO, Luiz Antonio; DIAZ, Patrícia Silva. Chitosan-based nanofibers for enzyme immobilization. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 183, p. 1959–1970, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.05.214>.

RICARDI, Natália Carminatti; ARENAS, Leliz Ticoná; BENVENUTTI, Edilson Valmir; HINRICHS, Ruth; FLORES, Elí Emanuel Esparza; HERTZ, Plinho Francisco; COSTA, Tania Maria Haas. High performance biocatalyst based on  $\beta$ -d-galactosidase immobilized on mesoporous silica/titania/chitosan material. **Food Chemistry**, [S. l.], v. 359, p. 129890, 2021. DOI: 10.1016/J.FOODCHEM.2021.129890.

RICARDI, Natália Carminatti; DE MENEZES, Eliana Weber; VALMIR BENVENUTTI, Edilson; DA NATIVIDADE SCHÖFFER, Jéssie; HACKENHAAR, Camila Regina; HERTZ, Plinho Francisco; COSTA, Tania Maria Haas. Highly stable novel silica/chitosan support for  $\beta$ -galactosidase immobilization for application in dairy technology. **Food Chemistry**, [S. l.], v. 246, p. 343–350, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.11.026>.

RICO-RODRIGUEZ, Fabián; STRANI, Lorenzo; GRASSI, Silvia; LANCHEROS, Ruth; SERRATO, Juan Carlos; CASIRAGHI, Ernestina. Study of Galactooligosaccharides production from dairy waste by FTIR and chemometrics as Process Analytical Technology. **Food and Bioproducts Processing**, [S. l.], v. 126, p. 113–120, 2021. DOI: 10.1016/J.FBP.2020.12.009.

RODRIGUEZ-NOGALES, José Manuel; DELGADILLO, Angélica. Stability and catalytic kinetics of microencapsulated  $\beta$ -galactosidase in liposomes prepared by the dehydration–rehydration method. **Journal of Molecular Catalysis. B, Enzymatic**, [S. l.], v. 1–2, n. 33, p. 15–21, 2005. DOI: 10.1016/J.MOLCATB.2005.01.003.

SAMANTHA, Serra Costa; BRUNA, Aparecida Souza Machado; ADRIANA, Regina Martin; FABIO, Bagnara; SANDRO, Andre Ragadalli; ALINE, Rabello Costa Alves. Drying

by spray drying in the food industry: Micro-encapsulation, process parameters and main carriers used. **African Journal of Food Science**, [S. l.], v. 9, n. 9, p. 462–470, 2015. DOI: <https://doi.org/10.5897/AJFS2015.1279>.

SAMETI, M.; BOHR, G.; RAVI KUMAR, M. N. V.; KNEUER, C.; BAKOWSKY, U.; NACKEN, M.; SCHMIDT, H.; LEHR, C. M. Stabilisation by freeze-drying of cationically modified silica nanoparticles for gene delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, [S. l.], v. 266, n. 1–2, p. 51–60, 2003. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(03\)00380-6](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(03)00380-6).

SANTANA, Audirene A.; OLIVEIRA, Rafael A. De; KUROZAWA, Louise E.; PARK, Kil J. Microencapsulation of pequi pulp by spray drying: use of modified starches as encapsulating agent. **Engenharia Agrícola**, [S. l.], v. 34, n. 5, p. 980–991, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-69162014000500017>.

SAQIB, Shaima; AKRAM, Attiya; HALIM, Sobia Ahsan; TASSADUQ, Raazia. Sources of  $\beta$ -galactosidase and its applications in food industry. **3 Biotech**, [S. l.], v. 7, n. 1, p. 79, 2017. DOI: [://doi.org/10.1007/s13205-017-0645-5](https://doi.org/10.1007/s13205-017-0645-5).

SASHIWA, Hitoshi; KAWASAKI, Norioki; NAKAYAMA, Atsuyoshi; MURAKI, Einosuke; YAMAMOTO, Noboru; AIBA, Sei-ichi. Chemical Modification of Chitosan. 14: Synthesis of Water-Soluble Chitosan Derivatives by Simple Acetylation. **Biomacromolecules**, [S. l.], v. 3, n. 5, p. 1126–1128, 2002. DOI: [10.1021/bm0200480](https://doi.org/10.1021/bm0200480).

SASS, Ann-Cathérine; JÖRDENING, Hans-Joachim. Immobilization of  $\beta$ -Galactosidase From *Aspergillus oryzae* on Electrospun Gelatin Nanofiber Mats for the Production of Galactooligosaccharides. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, [S. l.], v. 191, n. 3, p. 1155–1170, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12010-020-03252-7>.

SCHUSTER-WOLFF-BÜHRING, R.; FISCHER, L.; HINRICHS, J. Production and physiological action of the disaccharide lactulose. **International Dairy Journal**, [S. l.], v. 20, n. 11, p. 731–741, 2010. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.idairyj.2010.05.004>.

SCOTT, Felipe; VERA, Carlos; CONEJEROS, Raúl. Technical and Economic Analysis of Industrial Production of Lactose-Derived Prebiotics With Focus on Galacto-Oligosaccharides. **Lactose-Derived Prebiotics: A Process Perspective**, [S. l.], p. 261–284, 2016. DOI: [10.1016/B978-0-12-802724-0.00007-X](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802724-0.00007-X).

SEDDIGH, Samin; DARABI, Maryam. Comprehensive analysis of beta-galactosidase protein in plants based on *Arabidopsis thaliana*. **Turkish Journal of Biology**, [S. l.], v. 38, n. 1, p. 140–150, 2014. DOI: <http://doi.org/10.3906/biy-1307-14>.

SEL, Evren; ULU, Ahmet; ATEŞ, Burhan; KÖYTEPE, Süleyman. Comparative study of catalase immobilization via adsorption on P(MMA-co-PEG500MA) structures as an effective polymer support. **Polymer Bulletin** 2020 78:5, [S. l.], v. 78, n. 5, p. 2663–2684, 2020. DOI: [10.1007/S00289-020-03233-0](https://doi.org/10.1007/S00289-020-03233-0).

SEN, Pramita; NATH, Arijit; BHATTACHARJEE, Chiranjib; CHOWDHURY, Ranjana; BHATTACHARYA, Pinaki. Process engineering studies of free and micro-encapsulated  $\beta$ -galactosidase in batch and packed bed bioreactors for production of galactooligosaccharides. **Biochemical Engineering Journal**, [S. l.], v. 90, p. 59–72, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2014.05.006>.

SEREY, Marcela; VERA, Carlos; GUERRERO, Cecilia; ILLANES, Andrés. Immobilization of *Aspergillus oryzae*  $\beta$ -galactosidase in cation functionalized agarose matrix and its application in the synthesis of lactulose. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 167, p. 1564–1574, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.11.110>.

SHAFI, Azra; AHMED, Faizan; HUSAIN, Qayyum.  $\beta$ -Galactosidase mediated synthesized nanosupport for the immobilization of same enzyme: Its stability and application

in the hydrolysis of lactose. *International Journal of Biological Macromolecules*, [S. l.], v. 184, p. 57–67, 2021. DOI: 10.1016/J.IJBIOMAC.2021.06.034.

SHAHIDI, Fereidoon; HAN, Xiao-Qing. Encapsulation of food ingredients. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, [S. l.], v. 33, n. 6, p. 501–547, 1993. DOI: <https://doi.org/10.1080/10408399309527645>.

SHARMA, Shiv K.; LEBLANC, Roger M. Biosensors based on  $\beta$ -galactosidase enzyme: Recent advances and perspectives. *Analytical Biochemistry*, [S. l.], v. 535, p. 1–11, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ab.2017.07.019>.

SHARMA, Shiv K.; SHARMA, Sijan P.; LEBLANC, Roger M. Methods of detection of  $\beta$ -galactosidase enzyme in living cells. *Enzyme and Microbial Technology*, [S. l.], v. 150, p. 109885, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109836>.

SHELDON, Roger A. Characteristic features and biotechnological applications of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs). *Applied Microbiology and Biotechnology*, [S. l.], v. 92, n. 3, p. 467–477, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3554-2>.

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

SHUKLA, Triveni Piasad; WIERZBICKI, Leopold E. **Beta-galactosidase technology: A solution to the lactose problem.** <http://dx.doi.org/10.1080/10408397509527178>, [S. l.], v. 5, n. 3, p. 325–356, 2009. DOI: 10.1080/10408397509527178.

SINGH, Shalini; MANGLA, Jyoti; SINGH, Sanamdeep. Evaluation of *Aspergillus fumigatus* NTCC1222 as a source of enzymes for detergent industry. *Resources, Environment and Sustainability*, [S. l.], v. 5, p. 100030, 2021. DOI: 10.1016/J.RESENV.2021.100030.

SNEHA, H. P.; BEULAH, K. C.; MURTHY, Pushpa S. Enzyme Immobilization Methods and Applications in the Food Industry. **Enzymes in Food Biotechnology: Production, Applications, and Future Prospects**, [S. l.], p. 645–658, 2019. DOI: 10.1016/B978-0-12-813280-7.00037-2.

SOARES, Ariana de Souza; LEITE JÚNIOR, Bruno Ricardo de Castro; TRIBST, Alline Artigiani Lima; AUGUSTO, Pedro Esteves Duarte; RAMOS, Afonso Mota. Effect of ultrasound on goat cream hydrolysis by lipase: Evaluation on enzyme, substrate and assisted reaction. *LWT*, [S. l.], v. 130, p. 109636, 2020. DOI: 10.1016/J.LWT.2020.109636.

SOHAIL, Asma; TURNER, Mark S.; COOMBES, Allan; BOSTROM, Thor; BHANDARI, Bhesh. Survivability of probiotics encapsulated in alginate gel microbeads using a novel impinging aerosols method. *International Journal of Food Microbiology*, [S. l.], v. 145, n. 1, p. 162–168, 2011. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.12.007.

SOUSA, Carla Cristina De; RESENDE, Miriam Maria De; FALLEIROS, Larissa Nayhara Soares Santana; RIBEIRO, Eloízio Júlio. **Synthesis and Immobilization of  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces marxianus* Using Ion Exchange Resin.** <https://home.liebertpub.com/ind>, [S. l.], v. 17, n. 1, p. 27–37, 2021. DOI: 10.1089/IND.2020.0007.

SOUZA, Clitor J. F.; COMUNIAN, Talita A.; KASEMODEL, Márcia G. C.; FAVARO-TRINDADE, Carmen S. Microencapsulation of lactase by W/O/W emulsion followed by complex coacervation: Effects of enzyme source, addition of potassium and core to shell ratio on encapsulation efficiency, stability and kinetics of release. *Food Research International*, [S. l.], v. 121, p. 754–764, 2019. a. DOI: 10.1016/j.foodres.2018.12.053.

SOUZA, Clitor J. F.; GARCIA-ROJAS, Edwin E.; FAVARO-TRINDADE, Carmen S. Lactase ( $\beta$ -galactosidase) immobilization by complex formation: Impact of biopolymers on

enzyme activity. **Food Hydrocolloids**, [S. l.], v. 83, p. 88–96, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.04.044>.

SOUZA, Clitor J. F.; GARCIA-ROJAS, Edwin E.; SOUZA, Clyselen S. F.; VRIESMANN, Lúcia C.; VICENTE, Juarez; CARVALHO, Mario G. De; PETKWICZ, Carmen L. O.; FAVARO-TRINDADE, Carmen S. Immobilization of  $\beta$ -galactosidase by complexation: Effect of interaction on the properties of the enzyme. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 122, p. 594–602, 2019. b. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.11.007>.

SOUZA, Kely Viviane De; PERALTA-ZAMORA, Patricio; ZAWADZKI, Sônia Faria. Imobilização de ferro (II) em matriz de alginato e sua utilização na degradação de corantes têxteis por processos Fenton. **Química Nova**, [S. l.], v. 31, n. 5, p. 1145–1149, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422008000500041>.

SQUILLANTE, E.; MORSHED, G.; BAGCHI, S.; MEHTA, K. A. Microencapsulation of  $\beta$ -galactosidase with Eudragit L-100. **Journal of Microencapsulation**, [S. l.], v. 20, n. 2, p. 153–167, 2003. DOI: <https://doi.org/10.3109/02652040309178058>.

STORZ, Elizabeth; STEFFENS, Klaus-Jürgen. Feasibility Study for Determination of the Dextrose Equivalent (DE) of Starch Hydrolysis Products with Near-Infrared Spectroscopy (NIRS). **Starch - Stärke**, [S. l.], v. 56, n. 2, p. 58–62, 2004. DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/star.200300220>.

SUNAR, K.; KUMAR, U.; DESHMUKH, S. K. Recent Applications of Enzymes in Personal Care Products. In: *Agro-Industrial Wastes as Feedstock for Enzyme Production*. [s.l.] Elsevier, 2016. p. 279–298. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802392-1.00012-5>.

SUTAY KOCABAŞ, Didem; LYNE, John; USTUNOL, Zeynep. Hydrolytic enzymes in the dairy industry: Applications, market and future perspectives. **Trends in Food Science & Technology**, [S. l.], v. 119, p. 467–475, 2022. DOI: 10.1016/J.TIFS.2021.12.013.

SZILAGYI, Andrew; ISHAYEK, Norma. Lactose Intolerance, Dairy Avoidance, and Treatment Options. **Nutrients**, [S. l.], v. 10, n. 12, p. 1–30, 2018. DOI: <https://doi.org/10.3390/nu10121994>.

TALBERT, Joey N.; GODDARD, Julie M. Enzymes on material surfaces. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [S. l.], v. 93, p. 8–19, 2012. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.01.003>.

TAPIA-BLÁCIDO, D. R.; DO AMARAL SOBRAL, P. J.; MENEGALLI, F. C. Optimization of amaranth flour films plasticized with glycerol and sorbitol by multi-response analysis. **LWT - Food Science and Technology**, [S. l.], v. 44, n. 8, p. 1731–1738, 2011. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2011.04.004>.

TESTER, Richard F.; KARKALAS, John; QI, Xin. Starch—composition, fine structure and architecture. **Journal of Cereal Science**, [S. l.], v. 39, n. 2, p. 151–165, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2003.12.001>.

THANGARAJ, Baskar; SOLOMON, Pravin Raj. Immobilization of Lipases – A Review. Part I: Enzyme Immobilization. **ChemBioEng Reviews**, [S. l.], v. 6, n. 5, p. 157–166, 2019. DOI: 10.1002/CBEN.201900016.

TISS, Ali; CARRIÈRE, Frédéric; VERGER, Robert. Effects of Gum Arabic on Lipase Interfacial Binding and Activity. **Analytical Biochemistry**, [S. l.], v. 294, n. 1, p. 36–43, 2001. DOI: <https://doi.org/10.1006/abio.2001.5095>.

TIZCHANG, Samira; KHIABANI, Mahmood Sowti; MOKARRAM, Reza Rezaei; HAMISHEHKAR, Hamed; MOHAMMADI, Najmeh Sabahi; CHISTI, Yusuf. Immobilization of  $\beta$ -galactosidase by halloysite-adsorption and entrapment in a cellulose nanocrystals matrix.

**Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, [S. l.], v. 1865, n. 6, p. 129896, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2021.129896>.

TODEA, Anamaria; BENEÁ, Ioana Cristina; BÎTCAN, Ioan; PÉTER, Francisc; KLÉBERT, Szilvia; FECZKÓ, Tivadar; KÁROLY, Zoltán; BIRÓ, Emese. One-pot biocatalytic conversion of lactose to gluconic acid and galacto-oligosaccharides using immobilized  $\beta$ -galactosidase and glucose oxidase. **Catalysis Today**, [S. l.], v. 366, p. 202–211, 2021. DOI: <https://doi-org.ez15.periodicos.capes.gov.br/10.1016/j.cattod.2020.06.090>.

TORRES, Duarte P. M.; GONÇALVES, Maria do Pilar F.; TEIXEIRA, José A.; RODRIGUES, Lígia R. Galacto-Oligosaccharides: Production, Properties, Applications, and Significance as Prebiotics. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, [S. l.], v. 9, n. 5, p. 438–454, 2010. DOI: <https://ift.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1541-4337.2010.00119.x>.

TREISTER-GOLTZMAN, Y.; FRIGER, M.; PELEG, R. Does primary lactase deficiency reduce bone mineral density in postmenopausal women: A systematic review and meta-analysis. **Osteoporosis International** 2018 29:11, [S. l.], v. 29, n. 11, p. 2399–2407, 2018. DOI: 10.1007/S00198-018-4635-1.

TRIBST, Alline A. L.; AUGUSTO, Pedro E. D.; CRISTIANINI, Marcelo. Multi-pass high pressure homogenization of commercial enzymes: Effect on the activities of glucose oxidase, neutral protease and amyloglucosidase at different temperatures. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, [S. l.], v. 18, p. 83–88, 2013. DOI: 10.1016/J.IFSET.2013.01.002.

UBILLA, Claudia; RAMÍREZ, Nicolás; VALDIVIA, Felipe; VERA, Carlos; ILLANES, Andrés; GUERRERO, Cecilia. **Synthesis of Lactulose in Continuous Stirred Tank Reactor With  $\beta$ -Galactosidase of *Apergillus oryzae* Immobilized in Monofunctional Glyoxyl Agarose Support**. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, [S. l.], v. 8, p. 699, 2020. DOI: 10.3389/FBIOE.2020.00699/BIBTEX.

URETA, Maria Micaela; MARTINS, Gonçalo Nuno; FIGUEIRA, Onofre; PIRES, Pedro Filipe; CASTILHO, Paula Cristina; GOMEZ-ZAVAGLIA, Andrea. **Recent advances in  $\beta$ -galactosidase and fructosyltransferase immobilization technology**. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1783639>, [S. l.], v. 61, n. 16, p. 2659–2690, 2020. DOI: 10.1080/10408398.2020.1783639.

VAN LEUSEN, Ellen; TORRINGA, Erik; GROENINK, Paul; KORTLEVE, Pieter; GEENE, Renske; SCHOTERMAN, Margriet; KLARENBEER, Bert. Industrial Applications of Galactooligosaccharides. **Food Oligosaccharides: Production, Analysis and Bioactivity**, [S. l.], v. 9781118426, p. 470–491, 2014. DOI: 10.1002/9781118817360.CH25.

VARJÚ, Péter; YSTAD, Birgit; GEDE, Noémi; HEGYI, Péter; PÉCSI, Dániel; CZIMMER, József. The role of small intestinal bacterial overgrowth and false positive diagnosis of lactose intolerance in southwest Hungary—A retrospective observational study. **Plos one**, [S. l.], v. 15, n. 5, p. 1–13, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0230784>.

VASILJEVIC, T.; JELEN, Paul. Drying and storage of crude  $\beta$ -galactosidase extracts from *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* 11842. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, [S. l.], v. 4, n. 3, p. 319–329, 2003. DOI: 10.1016/S1466-8564(03)00022-5.

VERA, Carlos; GUERRERO, Cecilia; ABURTO, Carla; CORDOVA, Andrés; ILLANES, Andrés. Conventional and non-conventional applications of  $\beta$ -galactosidases. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**, [S. l.], v. 1868, n. 1, p. 140271, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2019.140271>.

VIEIRA, Ana Paula; NICOLETI, Joel Fernando; TELIS, Vânia Regina Nicoletti. Liofilização de fatias de abacaxi: avaliação da cinética de secagem e da qualidade do produto.

Brazilian **Journal of Food Technology**, [S. l.], v. 15, n. 1, p. 50–58, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1981-67232012000100006>.

VOORDE, I. Van de; GOIRIS, K.; SYRYN, E.; VAN DEN BUSSCHE, C.; AERTS, G. Evaluation of the cold-active *Pseudoalteromonas haloplanktis*  $\beta$ -galactosidase enzyme for lactose hydrolysis in whey permeate as primary step of d-tagatose production. *Process Biochemistry*, [S. l.], v. 49, n. 12, p. 2134–2140, 2014. DOI: 10.1016/J.PROCBIO.2014.09.010.

WILEY, Andrea S. Lactose intolerance. **Evolution, Medicine, and Public Health**, [S. l.], v. 2020, n. 1, p. 47–48, 2020. DOI: 10.1093/EMPH/EOAA006.

WOLF, Mariane; TAMBOURGI, Elias Basile; PAULINO, Alexandre Tadeu. Stability of  $\beta$ -D-galactosidase immobilized in polysaccharide-based hydrogels. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, [S. l.], v. 609, p. 125679, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2020.125679>.

XAVIER, Janifer Raj; RAMANA, Karna Venkata; SHARMA, Rakesh Kumar.  $\beta$ -galactosidase: Biotechnological applications in food processing. **Journal of Food Biochemistry**, [S. l.], v. 42, n. 5, p. e12564, 2018. DOI: 10.1111/JFBC.12564.

YE, Mingli; KIM, Sungwon; PARK, Kinam. Issues in long-term protein delivery using biodegradable microparticles. **Journal of Controlled Release**, [S. l.], v. 146, n. 2, p. 241–260, 2010. DOI: 10.1016/j.jconrel.2010.05.011.

ZANETTI, Betina Giehl; SOLDI, Valdir; LEMOS-SENNA, Elenara. Efeito da adição de polietilenoglicóis nas formulações de microesferas de acetobutirato de celulose sobre a eficiência de encapsulação da carbamazepina e morfologia das partículas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, [S. l.], v. 38, n. 2, p. 229–236, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1516-93322002000200012>.

ZHANG, Chuanxiang; LI, Xiaolong; LIU, You-Nian; ZHANG, Fengqin. Utilization of Microcapsule Technology in Foods. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, [S. l.], v. 15, n. 12, p. 9330–9340, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1166/jnn.2015.9226>.

ZHANG, Hong-liang; WU, Si-hui; TAO, Yi; ZANG, Lin-quan; SU, Zheng-quan. Preparation and Characterization of Water-Soluble Chitosan Nanoparticles as Protein Delivery System. **Journal of Nanomaterials**, [S. l.], v. 2010, p. 1–5, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1155/2010/898910>.

ZHANG, Zipei; ZHANG, Ruojie; CHEN, Long; MCCLEMENTS, David Julian. Encapsulation of lactase ( $\beta$ -galactosidase) into  $\kappa$ -carrageenan-based hydrogel beads: Impact of environmental conditions on enzyme activity. **Food Chemistry**, [S. l.], v. 200, p. 69–75, 2016. DOI: 10.1016/J.FOODCHEM.2016.01.014.

ZHANG, Zipei; ZHANG, Ruojie; MCCLEMENTS, David Julian. Lactase ( $\beta$ -galactosidase) encapsulation in hydrogel beads with controlled internal pH microenvironments: Impact of bead characteristics on enzyme activity. **Food Hydrocolloids**, [S. l.], v. 67, p. 85–93, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.01.005>.

ZUCCA, Paolo; SANJUST, Enrico. Inorganic Materials as Supports for Covalent Enzyme Immobilization: Methods and Mechanisms. **Molecules** 2014, Vol. 19, Pages 14139–14194, [S. l.], v. 19, n. 9, p. 14139–14194, 2014. DOI: 10.3390/MOLECULES190914139.

## **CAPÍTULO 3 - EFEITO DE DIFERENTES MATERIAIS DE PAREDE NA FORMAÇÃO DE MICROPARTÍCULAS DE CÉLULAS DE *KLUYVEROMYCES MARXIANUS* QUE EXPRESSAM ATIVIDADE DE $\beta$ -GALACTOSIDASE**

### **3.1 INTRODUÇÃO**

A enzima  $\beta$ -galactosidase possui ampla aplicabilidade na indústria de alimentos, sendo sua principal função realizar a hidrólise da lactose. Essa reação apresenta diversas vantagens tecnológicas tais como maior poder adoçante; redução de cristalização da lactose; diminuição na incidência da reação de Maillard; desenvolvimento de produtos específicos para pessoas intolerantes a lactose entre outras (FISCHER et al., 2013; FOGLIANO et al., 2020; PRESTES et al., 2022; TREISTER-GOLTZMAN; FRIGER; PELEG, 2018).

Além das vantagens citadas, a enzima  $\beta$ -galactosidase tem sido amplamente estudada por sua relevância, uma vez que grande parcela da população tem dificuldades em consumir produtos com lactose devido à lactose (MUHAMMED ALSHANBERI et al., 2021; PANESAR; KUMARI; PANESAR, 2010). Para suprir as necessidades desses indivíduos, as empresas elaboraram alimentos com baixo teor de lactose ou “zero lactose” como são chamados os produtos com ausência desse carboidrato (DANTAS; VERRUCK; PRUDENCIO, 2019; ZINGONE et al., 2017). Esses produtos fazem parte de um nicho de mercado em expansão, dentro da indústria de laticínios é o mercado que mais cresce (DANTAS; VERRUCK; PRUDENCIO, 2019; DEKKER; KOENDERS; BRUINS, 2019; NÉMETH et al., 2020).

Outra funcionalidade da enzima  $\beta$ -galactosidase é a transglicosilação da lactose para sintetizar galacto-oligossacarídeos (GOSs). Os GOSs não são digeríveis, não são hidrolisados ou absorvidos pelo intestino, eles são fermentados seletivamente por bactérias intestinais benéficas, sendo classificados, portanto, como prebióticos. Outra característica dos GOSs é seu baixo teor de doçura, baixo valor calórico e baixa cariogenicidade (GROSOVÁ; ROSENBERG; REBROŠ, 2008; MAISCHBERGER et al., 2008; MUHAMMED ALSHANBERI et al., 2021).

As enzimas são muito sensíveis e existe grande dificuldade em manter sua estabilidade, especialmente quando estão em soluções, sendo que nesse estado também é necessário seu armazenamento sob refrigeração. Por outro lado, quando estão na forma sólida, são mais estáveis e podem ser acondicionadas à temperatura ambiente. Nesse contexto, a microencapsulação de enzimas pode ser uma alternativa para se obter enzimas sólidas, sendo

*Capítulo 3 – Efeito de diferentes materiais de parede na formação de micropartículas de células de Kluyveromyces marxianus que expressam atividade de β-galactosidase*

---

um atraente método para propiciar maior estabilidade e maior capacidade de conservação da atividade enzimática durante sua vida útil, além de facilitar seu armazenamento e transporte (ALVARADO-RAMÍREZ et al., 2021; AMERI; MAA, 2007; NAMALDI; ÇALIK; ULUDAG, 2007).

A microencapsulação é uma técnica usada para revestir materiais, nesse processo podem ser utilizados diversos tipos de polímeros como material de revestimento do núcleo. Esse processo possui inúmeras aplicações em diversas áreas, nas indústrias de alimentos é usada para encapsular aditivos (corantes, adoçantes, óleos essenciais), microrganismos, ácidos graxos, enzimas, entre outros produtos para as mais diversas finalidades (GHARSALLAOUI et al., 2012; MOVAHEDPOUR et al., 2022; MUKUNDAN et al., 2020).

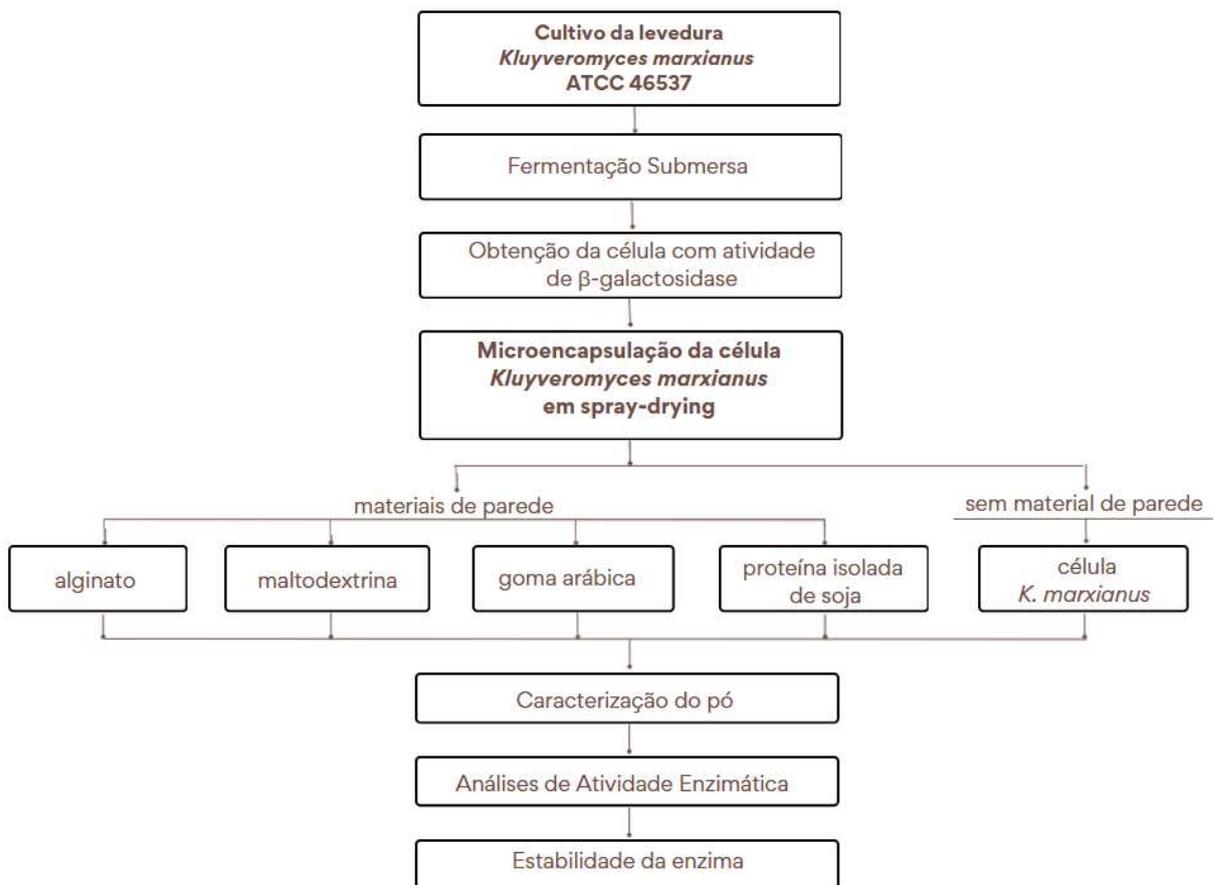
Existem vários métodos para se realizar a microencapsulação, para a escolha do melhor método deve ser considerado alguns aspectos, como: o tamanho das partículas que se deseja obter, tipo de núcleo e suas propriedades, tipo de material de parede e suas propriedades, escala de produção, custo entre outros fatores. o *spray drying* é um exemplo de método. Nesse processo diversas gotículas da solução são aspergidas e entram em contato com o ar de secagem, formando em poucos segundos partículas secas (GHARSALLAOUI et al., 2007; NGUYEN et al., 2022).

O objetivo deste trabalho é avaliar o processo de microencapsulação em *spray dryer* da célula de *Kluyveromyces marxianus* que expressa atividade da β-galactosidase, bem como avaliar as propriedades das micropartículas formadas e sua estabilidade térmica, pH e à estocagem.

### 3.2 MATERIAL E MÉTODOS

Neste tópico estão descritos os materiais utilizados, o desenvolvimento experimental e a metodologia empregada. No Fluxograma da Figura 3.1 estão ilustradas as etapas realizadas neste estudo.

Figura 3.1 - Fluxograma do desenvolvimento da metodologia experimental.



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

As metodologias empregadas nas etapas descritas no fluxograma serão detalhadas nos tópicos seguintes.

#### 3.2.1 Material

Para a microencapsulação utilizou-se células do microrganismo *Kluyveromyces marxianus* ATCC 46537 com atividade de  $\beta$ -galactosidase, levedura proveniente da Coleção de

### *Capítulo 3 – Efeito de diferentes materiais de parede na formação de micropartículas de células de Kluyveromyces marxianus que expressam atividade de $\beta$ -galactosidase*

---

Culturas Tropicais da Fundação André Tosello de Campinas (SP), na forma reativada (slants sem duplicata). O certificado de análise pode ser visto no Anexo A.

A cultura foi mantida a 4 °C em meio Ágar-Extrato de malte para levedura (A-EM) conforme metodologia recomendada pela Fundação André Tosello. O meio de manutenção (A-EM) utilizado continha extrato de levedura, peptona, glicose e ágar nas seguintes proporções: 3,0 g/L; 5,0 g/L; 13,0 g/L e 20,0 g/L respectivamente. A cultura foi repicada mensalmente.

O substrato utilizado no presente trabalho foi cedido pela empresa LACTOSUL INDÚSTRIA DE LATICÍNIOS LTDA, situada na Rod. BR 158 – s/nº - Km 88 – Zona Rural – Piranhas/GO. O permeado de soro em pó da marca CENTRO OESTE LATICÍNIOS cuja especificação técnica está apresentada no Anexo B, foi utilizado como principal fonte de carbono, como lactose, na formulação dos meios de cultura para crescimento da levedura *K. marxianus* ATCC 46537.

Alginato de sódio (Dinâmica), goma arábica (Adicel), proteína isolada de soja – PIS (ADM) doada pela SUINCO – COOPERATIVA de SUINOCULTORES e maltodextrina D10 – MD (Ingredion), foram utilizados como agente encapsulante no processo de microencapsulação das células de *K. marxianus* por *spray drying*.

Os equipamentos utilizados foram: incubadora refrigerada com agitação da marca TECNAL (modelo TE – 421, Brasil); centrífuga refrigerada da marca Hermle Labor Technik, (modelo Z 326 K, Alemanha); medidor de atividade de água AQUALAB da marca Decagon (modelo Pawkit, Estados Unidos); atomizador *Spray dryer* da marca LABMAQ (modelo LM MSD 1.0, Brasil); Microscópio eletrônico de varredura Zeiss EVO MA 10, marca Oxford (modelo 51-ADD0048, Alemanha); espectrofotômetro Perkin Elmer (modelo Spectrum Two, com acessório de reflexão total atenuada – ATR, com reflexão interna de seleneto de zinco da marca Miracle ATR – Single Reflection ZnSe/L1600115)

#### 3.2.2 Metodologia

##### *3.2.2.1 Produção da levedura K. marxianus que expressa atividade da enzima $\beta$ -galactosidase e determinação da concentração celular*

Para o cultivo da levedura *K. marxianus* ATCC 46537 foram utilizados dois meios (inóculo e meio fermentação) a base de permeado de soro de leite com concentrações baseadas em Pinheiro et al. (2003) e Santiago et al. (SANTIAGO et al., 2004).

*Capítulo 3 – Efeito de diferentes materiais de parede na formação de micropartículas de células de Kluyveromyces marxianus que expressam atividade de  $\beta$ -galactosidase*

---

O inóculo foi preparado em tampão fosfato de sódio 0,2 M e pH 5,5. O meio inóculo foi composto por lactose (50,0 g/L) - presente no permeado de soro; extrato de levedura (6,0 g/L); sulfato de amônio (6,0 g/L); fosfato de potássio monobásico (5,0 g/L) e sulfato de magnésio heptahidratado (0,6 g/L).

O meio de fermentação foi preparado em tampão fosfato de sódio 0,2 M e pH 7,0, composto por lactose (100,0 g/L) – presente no permeado de soro; sulfato de amônio (6,26 g/L); fosfato de potássio monobásico (5,0 g/L) e sulfato de magnésio heptahidratado (0,6 g/L). Ambos os meios foram esterilizados em autoclave antes de serem utilizados e todos os reagentes utilizados foram de grau analítico, exceto a lactose, que foi proveniente do permeado de soro de leite.

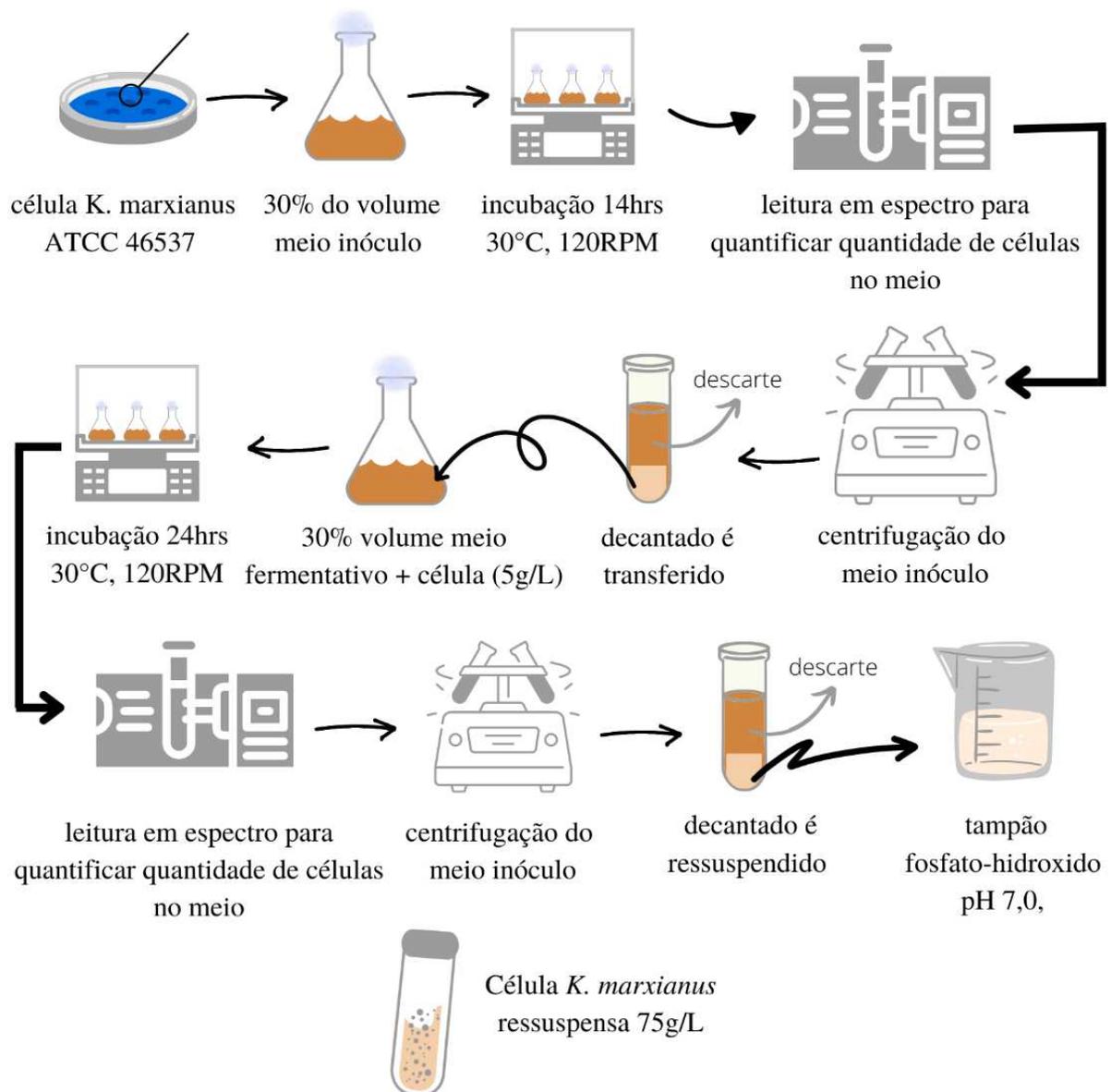
Para realizar a fermentação preparou-se o inóculo e o meio de fermentação conforme descrito anteriormente e ambos foram colocados em reator cônico de bancada constituído de um erlenmeyer de 250 mL ocupando 30% de seu volume total, fechado com rolha de gaze e algodão hidrófobo. Em seguida adicionou-se a levedura ao meio inóculo e o meio foi incubado a 30 °C, a 120 rpm por 14 horas em incubadora refrigerada com agitação. Findado o período de incubação, o inóculo foi centrifugado por 10 min a 5.000 rpm e o decantado foi transferido para o meio de fermentação na proporção de 5 g de células por litro de meio fermentado e em seguida iniciou-se a fermentação. A cultura foi mantida a 30 °C, 120 rpm por 24 h em incubadora refrigerada com agitação (SOUSA et al., 2021).

O caldo fermentado foi centrifugado e o decantado foi ressuspendido em tampão fosfato de potássio-hidróxido de sódio, concentração de 0,1M, pH 7,0, obtendo uma suspensão celular de 75 g/L (MANERA et al., 2008; NUMANOĞLU; SUNGUR, 2004; SOUSA et al., 2021). Na Figura 3.2 está ilustrado o processo da fermentação.

A concentração celular foi medida a partir da absorbância a 650 nm, convertida em massa seca de células através da curva padrão de biomassa seca em função da absorbância, apresentada no Apêndice A (SOUSA et al., 2021).

Capítulo 3 – Efeito de diferentes materiais de parede na formação de micropartículas de células de *Kluyveromyces marxianus* que expressam atividade de  $\beta$ -galactosidase

Figura 3.2 - Esquema do processo de fermentação.



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

### 3.2.2.2 Solução de alimentação do spray dryer

As soluções de revestimento foram preparadas na concentração de 2% (massa/volume) para todos os materiais de parede e agitadas por duas horas. As amostras desses materiais foram caracterizadas quanto à umidade, atividade de água, higroscopicidade e solubilidade em água,

*Capítulo 3 – Efeito de diferentes materiais de parede na formação de micropartículas de células de Kluyveromyces marxianus que expressam atividade de  $\beta$ -galactosidase*

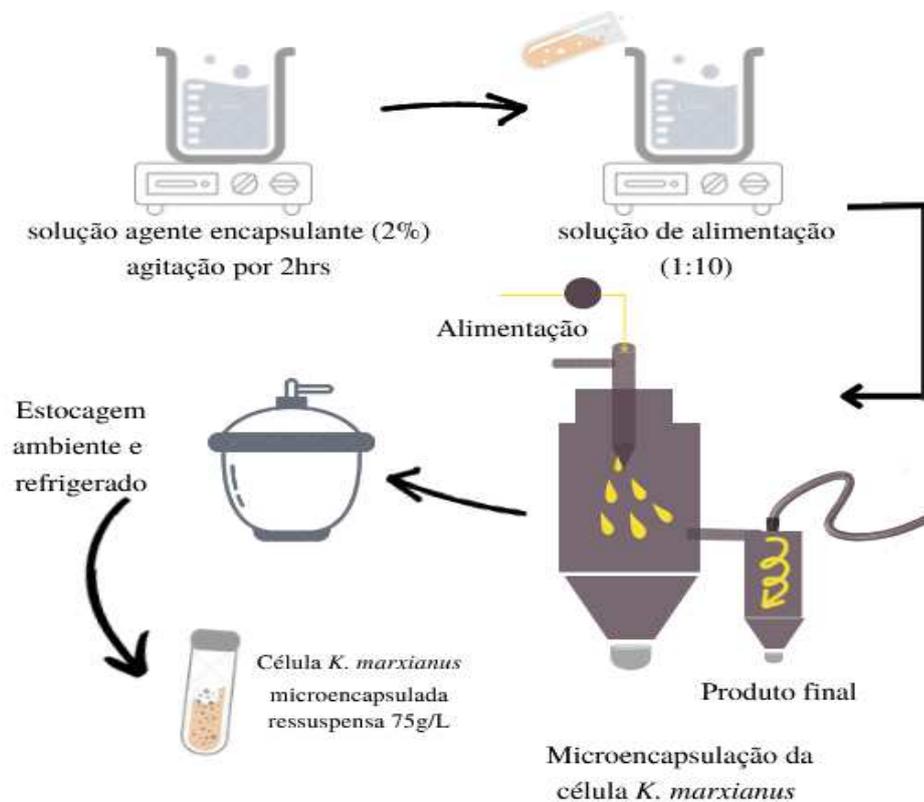
conforme metodologias descritas nos tópicos 3.2.2.2.1, 3.2.2.2.2, 3.2.2.2.3, e 3.2.2.2.4 respectivamente.

A suspensão da levedura *K. marxianus* foi misturada à solução do agente encapsulante, na proporção de 1:10 por 20 minutos para a alimentação do *spray dryer*, adaptado de Braga et al. (BRAGA et al., 2019). Antes de cada experimento realizou-se avaliação da umidade da solução de alimentação.

3.2.2.3 *Microencapsulação das células de K. marxianus*

O processo de atomização foi realizado em *spray dryer* capacidade de secagem de 1 L/h. Utilizou-se o bico atomizador de 1,2 mm, e fluxo de entrada de ar de 1,65 m<sup>3</sup>/min, temperatura do ar de secagem de 90 °C, fluxo da solução de alimentação igual a 0,600 L/h, taxa de atomização 40 L/min baseando em estudo realizado por Braga et al. (BRAGA et al., 2019). Na Figura 3.3 está ilustrado o esquema de microencapsulação realizado.

Figura 3.3 - Esquema de microencapsulação da célula *K. marxianus*.



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

*Capítulo 3 – Efeito de diferentes materiais de parede na formação de micropartículas de células de Kluyveromyces marxianus que expressam atividade de β-galactosidase*

---

*3.2.2.4 Caracterização e avaliação do rendimento de secagem das micropartículas obtidas com diferentes materiais de parede*

Análises físico-químicas foram realizadas para os materiais de parede utilizados e para as micropartículas formadas conforme descrito nos tópicos a seguir.

*3.2.2.4.1 Umidade*

A umidade das suspensões *K. marxianus*, dos materiais de parede e das micropartículas foram determinadas por método gravimétrico. Foram pesados aproximadamente 1 g das amostras em cápsulas de porcelana previamente pesadas. As cápsulas contendo as amostras foram levadas a estufa (não convectiva) a 105 °C, onde se mantiveram até a massa das mesmas permanecerem constantes conforme metodologia da A.O.A.C. (2005). A umidade das amostras, em base úmida (b.u.), foi calculada de acordo com a Equação 3.1.

$$Umidade (\%) = \frac{m_T - m_S}{m_T} \quad \text{Equação 3.1}$$

Onde  $m_S$  é a massa da amostra seca em g e  $m_T$  é a massa total utilizada como amostra em g.

*3.2.2.4.2 Atividade de água*

A atividade de água ( $a_w$ ) foi determinada nos materiais de parede e nas micropartículas secas. Utilizou-se o equipamento analisador de atividade de água de bancada, AQUALAB com leitura digital.

*3.2.2.4.3 Higroscopicidade*

Para determinação da higroscopicidade dos materiais de parede e das micropartículas produzidas utilizou-se de forma adaptada a metodologia de Cai e Corke (CAI; CORKE, 2000). Colocou-se 0,3 g das amostras em cápsulas de porcelana, as quais foram armazenadas em dessecador contendo solução saturada de cloreto de sódio, com umidade relativa de 70%, durante sete dias à temperatura ambiente. O resultado foi expresso em gramas de água adsorvida por 100 gramas de matéria seca (ms).

#### 3.2.2.4.4 Solubilidade em água

Para determinação da solubilidade realizou-se as análises conforme Cano-Chauca (CANO-CHAUCA et al., 2005). Pesou-se 0,5 g das amostras e colocou-as em béqueres contendo 50 mL de água destilada. Homogeneizou-se à temperatura ambiente em uma placa de agitação por trinta minutos a 100 rpm. Posteriormente a solução foi centrifugada, utilizando uma centrífuga de bancada digital; durante 5 min, a 3.500 rpm. O sobrenadante foi transferido para uma cápsula de porcelana de peso conhecido e levado à estufa (não convectiva) à 105°C até a massa se manter constante. O resultado foi expresso em porcentagem e calculado de acordo com a Equação 3.2.

$$\text{Solubilidade em água (\%)} = \frac{M_S}{M_T \times (1 - X_{\text{amostra}})} \times 100 \quad \text{Equação 3.2}$$

Onde  $M_S$  é a massa solubilizada presente no sobrenadante em g,  $M_T$  é a massa total da amostra em g e  $X_{\text{amostra}}$  é a umidade da amostra.

#### 3.2.2.4.5 Rendimento do processo de secagem

O rendimento do processo de secagem foi obtido por meio da razão entre a massa de sólidos do produto em pó coletado e a massa de sólidos alimentados ao secador (suspensão de *K. marxianus* com material de parede), conforme a Equação 3.3.

$$\text{Rendimento de secagem (\%)} = \frac{M_{\text{pó}}(1 - X_{w,\text{pó}})}{M_{\text{suspensão}}(1 - X_{w,\text{suspensão}})} \times 100 \quad \text{Equação 3.3}$$

Onde  $M_{\text{pó}}$  é a massa de pó coletada na base do ciclone após o processo de microencapsulação,  $M_{\text{suspensão}}$  é a massa alimentada no *spray dryer*,  $X_{w,\text{pó}}$  e  $X_{w,\text{suspensão}}$  são as frações de água presentes no pó obtido e na suspensão de *K. marxianus* com material de parede alimentadas no *spray dryer*, respectivamente.

*Capítulo 3 – Efeito de diferentes materiais de parede na formação de micropartículas de células de Kluyveromyces marxianus que expressam atividade de  $\beta$ -galactosidase*

---

*3.2.2.5 Avaliação microestrutural das micropartículas*

O Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) foi utilizado para realizar a análise microestrutural da levedura *K. marxianus* após a microencapsulação. As amostras foram colocadas nos *stubs* utilizando uma fita de carbono dupla face, metalizadas em banho de ouro e visualizadas no MEV.

*3.2.2.6 Avaliação por espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier com reflexão atenuada (FTIR-ATR)*

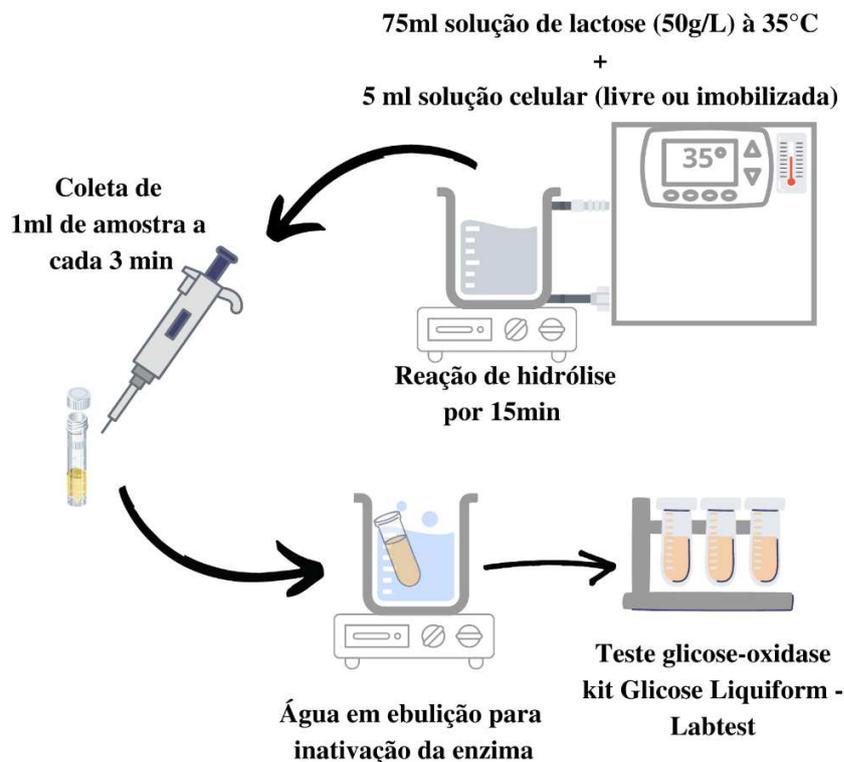
A estrutura dos materiais de parede e dos pós obtidos foram investigadas por espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) utilizando um espectrofotômetro Perkin Elmer com acessório de reflexão total atenuada – ATR, no Laboratório do Núcleo de Bioprocessos (NUCBIO – FEQUI/UFU). Os dados da análise de FTIR-ATR foram tomados na região de número de onda entre 500 e 4000  $\text{cm}^{-1}$  com resolução de 2  $\text{cm}^{-1}$ . Registrou-se 32 “scans” por amostra analisada.

*3.2.2.7 Determinação da atividade enzimática da  $\beta$ -galactosidase presente na célula de *K. marxianus* livre e microencapsulada*

A atividade enzimática da enzima  $\beta$ -galactosidase, na célula (livre) e imobilizada, foi determinada pelo método das taxas iniciais da reação de hidrólise de lactose, realizada em um reator de mistura, operando em batelada, com volume útil de 200 mL, dotado de uma camisa externa para circulação de água proveniente de banho termostático para controle da temperatura, submetido à agitação magnética. As dimensões do reator de mistura utilizado foram 8,2 cm de altura e 5,5 cm de diâmetro interno. Na Figura 3.4 está representado o esquema das etapas utilizadas para a determinação da atividade enzimática.

*Capítulo 3 – Efeito de diferentes materiais de parede na formação de micropartículas de células de *Kluyveromyces marxianus* que expressam atividade de  $\beta$ -galactosidase*

Figura 3.4 - Esquema para a determinação da atividade enzimática.



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Para determinação da atividade catalítica da enzima  $\beta$ -galactosidase utilizou-se solução de lactose (PA) 50 g/L, obtido a partir de tampão láctico recomendado pela NOVO NORDISK (NOVO NORDISK, 1993). A solução tampão láctico é constituída de citrato de sódio tribásico (0,795 g/L); ácido cítrico anidro (1,400 g/L); sulfato de potássio (0,180 g/L); fosfato de potássio bibásico (0,520 g/L); fosfato de potássio monobásico (1,470 g/L); hidróxido de potássio (1,090 g/L); cloreto de magnésio hexahidratado (0,830 g/L); cloreto de cálcio anidro (0,566 g/L); hidróxido de sódio (0,800 g/L) e bicarbonato de sódio (0,280 g/L). Os reagentes foram dissolvidos em água destilada e foi ajustado o pH em 6,5 com solução de ácido clorídrico 0,1 M.

Para cada experimento foi adicionado ao reator 5 mL do caldo ressuspendido a 75 mL de solução de lactose, em temperatura de 35 °C (SANTIAGO et al., 2004). Para a célula livre utilizou-se o caldo obtido após processo de fermentação. Para a célula imobilizada ressuspendeu-se o pó obtido em solução tampão de fosfato de potássio-hidróxido de sódio 0,1

### *Capítulo 3 – Efeito de diferentes materiais de parede na formação de micropartículas de células de *Kluyveromyces marxianus* que expressam atividade de $\beta$ -galactosidase*

---

M na concentração de 75 g/L. Essa concentração foi obtida por meio experimental, idealizando obter a mesma concentração da suspensão celular obtida na fermentação.

A unidade de atividade enzimática (U) é a quantidade de enzima que catalisa a conversão de um  $\mu\text{mol}$  de glicose produzida por minuto, avaliado nas condições experimentais à temperatura de 35 °C, pH 6,5, com uma concentração inicial de lactose de 50 g/L. Para cada experimento foram tomadas cinco amostras do meio reacional no intervalo de três em três minutos (3, 6, 9, 12 e 15 min).

Cada amostra foi colocada em um tubo de ensaio, o qual foi tampado e imediatamente colocado em um banho de água em ebulição, por 10 minutos. A glicose formada foi dosada pelo método da glicose-oxidase (BAO et al., 2004) utilizando o kit Glicose Liquiform da Labtest conforme Apêndice B. A atividade, a partir do método das taxas iniciais, para cada reação da hidrólise de lactose, foi obtida pela inclinação das equações lineares de concentração de glicose em função do tempo de reação. Os experimentos foram realizados em duplicata para uma maior confiabilidade nos resultados obtidos.

#### *3.2.2.8 Estudo da estabilidade ao armazenamento*

A célula *K. marxianus* microencapsulada foi armazenada em três condições diferentes: na forma ressuspensa sob refrigeração (entre 4 °C e 7 °C) e foi avaliada ao fim de 30 dias; na forma de pó sob refrigeração (entre 4 °C e 7 °C) e em temperatura ambiente (25 °C) onde foram analisadas em 30 e 60 dias determinando sua atividade enzimática. A atividade enzimática foi determinada pelo método das taxas iniciais, conforme o item 3.2.2.7. A atividade residual relativa foi calculada tendo como 100% a atividade da enzima imobilizada no primeiro dia.

#### *3.2.2.9 Estudo da estabilidade térmica*

Amostras dos pós obtidos foram ressuspensas conforme descrito no item 3.2.2.7 e foram incubadas em banho termostático a diferentes temperaturas. As condições avaliadas foram: 30 °C (24 horas), 35 °C (12 horas), 40 °C (5 horas) e 50 °C (30 minutos). As amostras foram coletadas ao longo do tempo, resfriadas em banho de gelo e em seguida a atividade enzimática foi determinada de acordo com o item 3.2.2.7. Os resultados da atividade enzimática residual em função do tempo de incubação, para cada temperatura foram ajustados para o modelo de desativação térmica de primeira ordem (Equação 3.4). O ajuste foi realizado pelo método

*Capítulo 3 – Efeito de diferentes materiais de parede na formação de micropartículas de células de Kluyveromyces marxianus que expressam atividade de β-galactosidase*

numérico Levenberg-Marquardt usando o *software* Statistica 7.0, determinando o parâmetro cinético (HENLEY; SADANA, 1985).

$$\frac{A}{A_0} = e^{(-k_d \cdot t)} \quad \text{Equação 3.4}$$

Sendo:  $\frac{A}{A_0}$  atividade relativa e  $k_d$  a constante cinética de desativação térmica.

Para cada temperatura foram determinados os tempos de meia vida ( $t_{\frac{1}{2}}$ ) utilizando as Equação 3.5. O cálculo foi realizado utilizando os parâmetros encontrados na equação anterior (3.4).

$$t_{\frac{1}{2}} = -\frac{\ln(0,5)}{k_d} \quad \text{Equação 3.5}$$

A energia de ativação da desativação térmica foi calculada pela equação de Arrhenius linearizada (Equação 3.6).

$$\ln(k_d) = \ln(A^*) - \frac{E_a}{R} \cdot \frac{1}{T} \quad \text{Equação 3.6}$$

Onde:  $A^*$  fator de frequência para a reação;  $E_a$  energia de ativação do processo de desativação térmica;  $T$  temperatura absoluta e  $R$  é a constante da lei dos gases ideais.

O ajuste foi realizado a um nível de 90% de significância e verificou-se o valor do coeficiente de determinação ( $R^2$ ) e o valor da soma do quadrado dos desvios para observar se o ajuste se adequava aos resultados experimentais.

### 3.2.2.10 Estudo da estabilidade ao pH

As amostras obtidas no *spray dryer* foram armazenadas a -15 °C até a sua posterior utilização. Foram preparadas soluções tampão fosfato de potássio-hidróxido de sódio 0,1 M em diferentes valores de pH, sendo eles: 6,0; 6,5; 7,0; 7,3; 7,5 e 8,0. As amostras foram ressuspensas nas diferentes soluções tampão e incubadas em banho termostático a 30 °C por 12 horas (SOUSA et al., 2021). Em seguida, as amostras foram retiradas e a atividade enzimática

### Capítulo 3 – Efeito de diferentes materiais de parede na formação de micropartículas de células de *Kluyveromyces marxianus* que expressam atividade de $\beta$ -galactosidase

foi avaliada conforme o item 3.2.2.7. A atividade residual relativa foi calculada, tendo como 100% a atividade inicial da enzima.

#### 3.2.2.11 Análise de dados

Os dados obtidos foram tabulados e os gráficos construídos utilizando o programa Microsoft Excel® e *software* Origin® 2023. Para verificar se houve diferença significativa entre os dados por meio da ANOVA e Teste Tukey com nível de 5% de significância utilizou-se o programa estatístico Statistica 7.

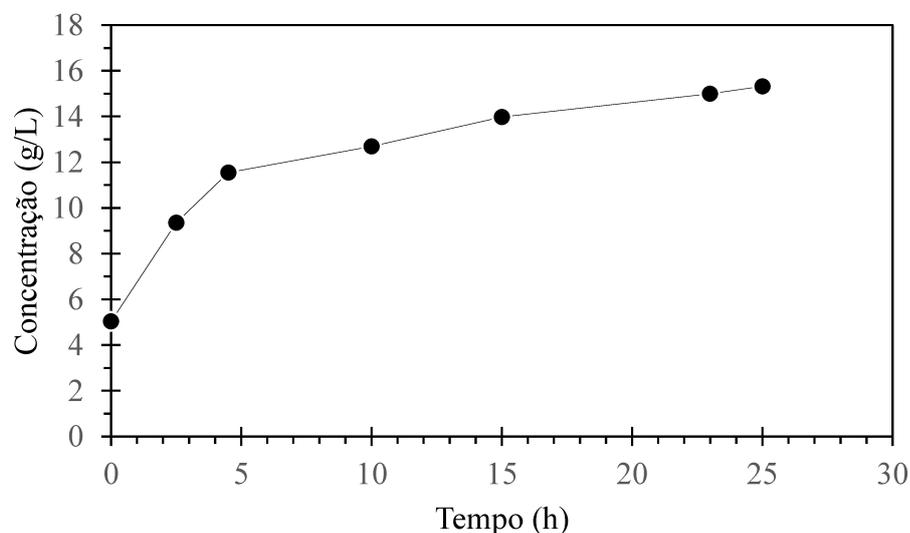
## 3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste tópico são apresentados e discutidos os principais resultados obtidos no decorrer deste trabalho.

### 3.3.1 Produção da levedura *K. marxianus* que expressa atividade da enzima $\beta$ -galactosidase

Na Figura 3.5 pode ser observado o perfil de concentração de biomassa durante a fermentação. Foram utilizadas condições de fermentação da *K. marxianus* ATCC 46537 que expressam atividade de  $\beta$ -galactosidase otimizadas por Falleiros et al. (FALLEIROS et al., 2015).

Figura 3.5 - Perfil de concentração de biomassa durante a fermentação da *K. marxianus*.



*Capítulo 3 – Efeito de diferentes materiais de parede na formação de micropartículas de células de Kluyveromyces marxianus que expressam atividade de β-galactosidase*

A levedura *K. marxianus* foi capaz de fermentar a lactose presente no permeado de soro de leite aumentando sua biomassa, no decorrer da fermentação o substrato foi consumido e houve a formação de compostos que inibem a multiplicação das leveduras como o etanol, resultando na redução da produção de biomassa ao longo do tempo. Nas condições utilizadas, foi possível utilizar um subproduto da indústria para gerar células que expressam atividade enzimática, e os valores obtidos para a concentração celular foram de acordo com os valores reportados por Falleiros et al. (FALLEIROS et al., 2015) e Sousa et al. (SOUSA et al., 2021). A concentração de biomassa nas primeiras 2,5 h passou de 5,03 g/L a 9,36 g/L e ao término da fermentação, no tempo de 25 horas, o meio fermentativo apresentou um valor final de 15,32 g/L.

### 3.3.2 Caracterização e avaliação do rendimento de secagem das micropartículas obtidas com diferentes materiais de parede

Os polímeros utilizados como materiais de parede possuem propriedades físicas e químicas que podem produzir materiais de diferentes características (RODRÍGUEZ-RESTREPO; GIRALDO; RODRÍGUEZ-BARONA, 2017), desta forma os polímeros foram caracterizados quanto à solubilidade, atividade de água, higroscopicidade e umidade, e os resultados obtidos estão dispostos na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 - Parâmetros físico-químicos dos polímeros.

<b>Polímeros e micropartículas</b>	<b>Umidade (%)</b>	<b>Atividade de água</b>	<b>Higroscopicidade (g / 100 g de ms)</b>	<b>Solubilidade (%)</b>
Alginato	11,3 ± 0,2 <sup>a</sup>	0,60 ± 0,01 <sup>a</sup>	13 ± 1 <sup>b</sup>	79 ± 2 <sup>a</sup>
Maltodextrina	4,5 ± 0,2 <sup>c</sup>	0,56 ± 0,01 <sup>a</sup>	11 ± 1 <sup>b</sup>	89 ± 4 <sup>a</sup>
Goma arábica	8,8 ± 0,1 <sup>ab</sup>	0,56 ± 0,01 <sup>a</sup>	12 ± 1 <sup>b</sup>	94 ± 1 <sup>a</sup>
PIS	6,5 ± 0,1 <sup>bc</sup>	0,55 ± 0,01 <sup>a</sup>	9 ± 1 <sup>b</sup>	31 ± 1 <sup>b</sup>

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 95% de confiança.

Realizou-se os testes de normalidade para aplicar a análise de variância (ANOVA) utilizando o *software* Statistica® 7.0, verificou-se que havia diferença entre pelo menos um dos grupos e para complementar a análise aplicou-se o teste de Tukey. De modo geral as amostras

*Capítulo 3 – Efeito de diferentes materiais de parede na formação de micropartículas de células de Kluyveromyces marxianus que expressam atividade de β-galactosidase*

de materiais puros apresentaram baixa umidade e baixa atividade de água, valores adequados para produtos secos.

Os valores de higroscopicidade variaram de 9 a 13 g/100 ms, considerados baixos, possibilitando o uso desses materiais para a microencapsulação visto que materiais armazenados em forma de pó não podem ser higroscópicos pois favorece a degradação do material durante a estocagem.

A solubilidade de todos os materiais de parede foi considerada adequada para utilização em microencapsulação por *spray drying* (31 à 94%), pois o método de secagem escolhido precisa de materiais que sejam pelo menos, parcialmente solúveis em água (DESAI; PARK, 2005). Durante a realização das secagens nenhum material ocasionou o entupimento no equipamento, problemas que normalmente ocorrem em secagens envolvendo materiais altamente viscosos ou insolúveis em água (CAL; SOLLOHUB, 2010; MOEJES et al., 2018). Os resultados de caracterização e rendimentos de secagem obtidos para as micropartículas estão dispostos na Tabela 3.2.

Tabela 3.2 - Parâmetros físico-químicos das micropartículas e rendimentos de secagem.

<b>Polímeros e micropartículas</b>	<b>Umidade (%)</b>	<b>Atividade de água</b>	<b>Higroscopicidade (g / 100 g de ms)</b>	<b>Solubilidade (%)</b>	<b>Rendimento (%)</b>
Tratamento 1	9 ± 1 <sup>ab</sup>	0,37 ± 0,01 <sup>a</sup>	38 ± 1 <sup>b</sup>	73 ± 7 <sup>bc</sup>	38 ± 2 <sup>ab</sup>
Tratamento 2	4 ± 1 <sup>c</sup>	0,40 ± 0,02 <sup>a</sup>	11 ± 1 <sup>c</sup>	86 ± 1 <sup>ab</sup>	20 ± 3 <sup>bc</sup>
Tratamento 3	6 ± 1 <sup>bc</sup>	0,39 ± 0,01 <sup>a</sup>	70 ± 1 <sup>a</sup>	84 ± 2 <sup>ab</sup>	8 ± 3 <sup>c</sup>
Tratamento 4	4 ± 1 <sup>c</sup>	0,37 ± 0,00 <sup>a</sup>	17 ± 1 <sup>d</sup>	60 ± 2 <sup>cd</sup>	17 ± 8 <sup>bc</sup>
Tratamento 5	6 ± 1 <sup>bc</sup>	0,29 ± 0,01 <sup>b</sup>	21 ± 1 <sup>c</sup>	44 ± 2 <sup>d</sup>	61 ± 4 <sup>a</sup>

**Tratamento 1:** célula e alginato; **tratamento 2:** célula e maltodextrina; **tratamento 3:** célula e goma arábica; **tratamento 4:** célula e proteína isolada de soja, **tratamento 5:** célula sem material de parede. \*n.a. não se aplica. As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Realizou-se os testes de normalidade para aplicar a análise de variância (ANOVA) utilizando o *software* Statística® 7.0, verificou-se que havia diferença entre pelo menos um dos grupos e para complementar a análise aplicou-se o teste de Tukey. De modo geral as amostras

*Capítulo 3 – Efeito de diferentes materiais de parede na formação de micropartículas de células de Kluyveromyces marxianus que expressam atividade de β-galactosidase*

---

de micropartículas apresentaram baixa umidade (inferior a 10%), característica desejável para uma boa estabilidade ao longo do tempo desses produtos (MASTERS, 1991; MUJUMDAR, 2014). A formulação contendo alginato de sódio como material de parede apresentou o maior percentual de umidade (9 %) em relação aos demais e a da proteína isolada de soja (4%) o menor.

Para melhor assegurar a estabilidade no armazenamento, deve-se também analisar conjuntamente os valores de atividade de água. Assim, observou-se que os valores obtidos de  $a_w$  para as micropartículas variaram de  $0,29 \pm 0,01$  a  $0,40 \pm 0,02$ , sendo esses valores inferiores ao estabelecido como seguros na literatura (0,60) para estocagem (CHIRIFE; DEL PILAR BUERA, 2009; FELLOWS, 2000; MUJUMDAR, 2007). Desta forma todos os pós obtidos encontram-se estáveis microbiologicamente se forem armazenados em condições adequadas, sendo reduzido o risco de desenvolvimento microbiano e de alterações das características do produto.

Os valores de higroscopicidade variaram de 11 a 70 g/100 ms para os tratamentos, portanto houve diferença significativa entre todos os tratamentos conforme mostrado na Tabela 3.2. Segundo a classificação da GEA Niro Research Laboratory (2015), o pó é ligeiramente higroscópico quando se encontra 10,1 - 15,0 g/100 ms e higroscópico quando 15,1 - 20,0 g/100 ms, desta forma as microcápsulas formadas no *spray dryer*, a partir da goma arábica, alginato de sódio e micropartícula sem material de parede (célula) são altamente higroscópicas, e as micropartículas formadas a partir de PIS são higroscópicas. Enquanto as amostras formadas a partir da maltodextrina podem ser classificadas como ligeiramente higroscópicas. Essa baixa higroscopicidade favorece a escolha da maltodextrina como bom agente encapsulante uma vez que produtos higroscópicos absorvem água do ambiente favorecendo a ocorrência de reações e proliferação microbiana.

Estatisticamente através do teste de Tukey podemos afirmar que houve diferença significativa entre os rendimentos das micropartículas. A célula seca sem material de parede apresentou o maior rendimento, seguida da célula com alginato, maltodextrina, PIS e goma arábica; 61, 38, 20, 17 e 8% respectivamente. Braga et. al. (2019) realizaram a secagem de *Trichoderma asperellum* utilizando maltodextrina D20 como material de parede em *spray dryer* com parâmetros de secagem fixados como temperatura de entrada 80 °C; concentração material de parede 8 (m/v), vazão de alimentação 0,6 L/h. Os autores encontraram rendimentos de secagem próximos para célula revestida com maltodextrina e sem material de parede (66,64%

*Capítulo 3 – Efeito de diferentes materiais de parede na formação de micropartículas de células de Kluyveromyces marxianus que expressam atividade de  $\beta$ -galactosidase*

---

e 49,01, respectivamente) deste modo o material de parede utilizado aumentou o rendimento quando usado em concentrações mais elevadas.

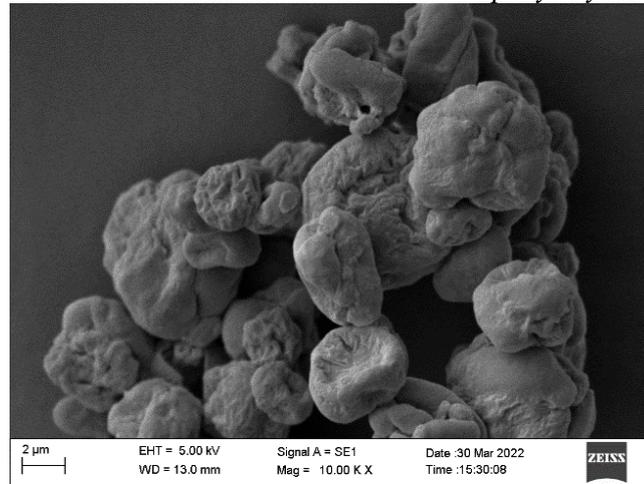
O tratamento com goma arábica apresentou a maior higroscopicidade de modo que há maior capacidade de absorção de umidade podendo levar a maiores interações com as moléculas de água, resultando na maior dificuldade de remoção da água conseqüentemente no menor rendimento de secagem. Ao realizar o desmonte do equipamento verificou-se que as partículas do tratamento 3 e 4 estavam muito incrustadas no equipamento em uma camada mais espessa que os demais tratamentos. O tratamento 5 apresentou maior facilidade na etapa de limpeza do equipamento pois havia pouquíssimo material aderido à superfície, fato que pode estar associado a baixa solubilidade (mas solúvel) e a higroscopicidade intermediária das partículas que podem favorecer a secagem do material com baixa aderência as paredes do equipamento. Em decorrência da perda de produto na parede do equipamento de secagem e no ar de saída do ciclone, o rendimento em experimentos de pequena escala nem sempre é o ideal, onde os manuais dos equipamentos laboratoriais relatam que o rendimento esteja em torno de 20% – 70%, contudo, em escala industrial, o rendimento tende a aumentar com o aumento de escala, pois a fração perdida é uma parte menor do volume de produção. Mesmo ocorrendo uma limitação no rendimento por ser um experimento de bancada, devemos observar que o rendimento de secagem do tratamento 5 tende a ser o melhor em uma escala de produção maior ainda que este tratamento não utilize de nenhum material de parede.

### 3.3.3 Avaliação microestrutural das células de *K. marxianus* microencapsulada e dos materiais de parede por microscopia eletrônica de varredura

Na Figura 3.6 tem-se a microscopia eletrônica de varredura da célula de *K. marxianus* seca em *spray dryer* nos mesmos parâmetros para formação das micropartículas com os materiais de parede. Componentes celulares são normalmente danificados pelo calor, pois quando aquecidos à determinadas temperaturas as enzimas e as membranas celulares alteram sua estrutura.

Capítulo 3 – Efeito de diferentes materiais de parede na formação de micropartículas de células de *Kluyveromyces marxianus* que expressam atividade de  $\beta$ -galactosidase

Figura 3.6 - Imagem MEV da célula *K. marxianus* seca em *spray dryer* sem material de parede.



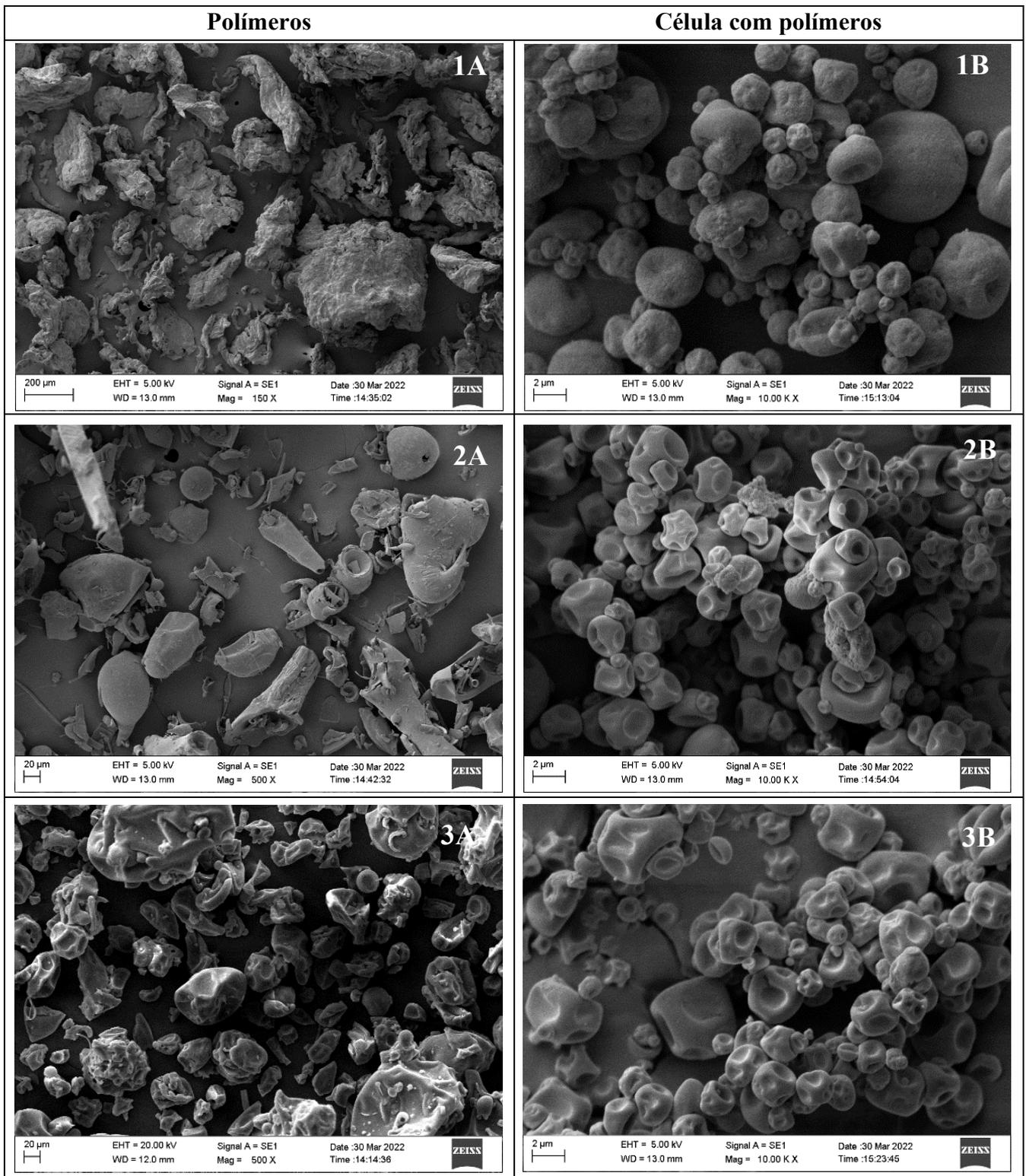
Amplificação 10000 vezes, intensidade do feixe (EHT) 5 kV, distância entre a amostra e a lente igual ou inferior a (WD) 13 mm.

As micropartículas formadas apresentaram um tamanho médio variado entre 4 e 6  $\mu\text{m}$ , superfície rugosa e irregular, a secagem por *spray drying* a temperatura de 90°C foi suficiente para realizar a secagem sem romper a estrutura celular, deste modo a enzima ficou protegida no interior da célula, apesar do decaimento da atividade enzimática após a secagem, ainda houve manutenção desta atividade pela capacidade da célula proteger a enzima contra a desnaturação durante a secagem.

As microscopias eletrônicas de varredura dos materiais de parede e as micropartículas formadas com os materiais de parede (alginato de sódio, maltodextrina, goma arábica e proteína isolada de soja) são mostradas na Figura 3.7, sendo que os materiais de parede estão representados por 1A, 2A, 3A e 4A e as microcápsulas representados por 1B, 2B, 3B, 4B.

Capítulo 3 – Efeito de diferentes materiais de parede na formação de micropartículas de células de *Kluyveromyces marxianus* que expressam atividade de  $\beta$ -galactosidase

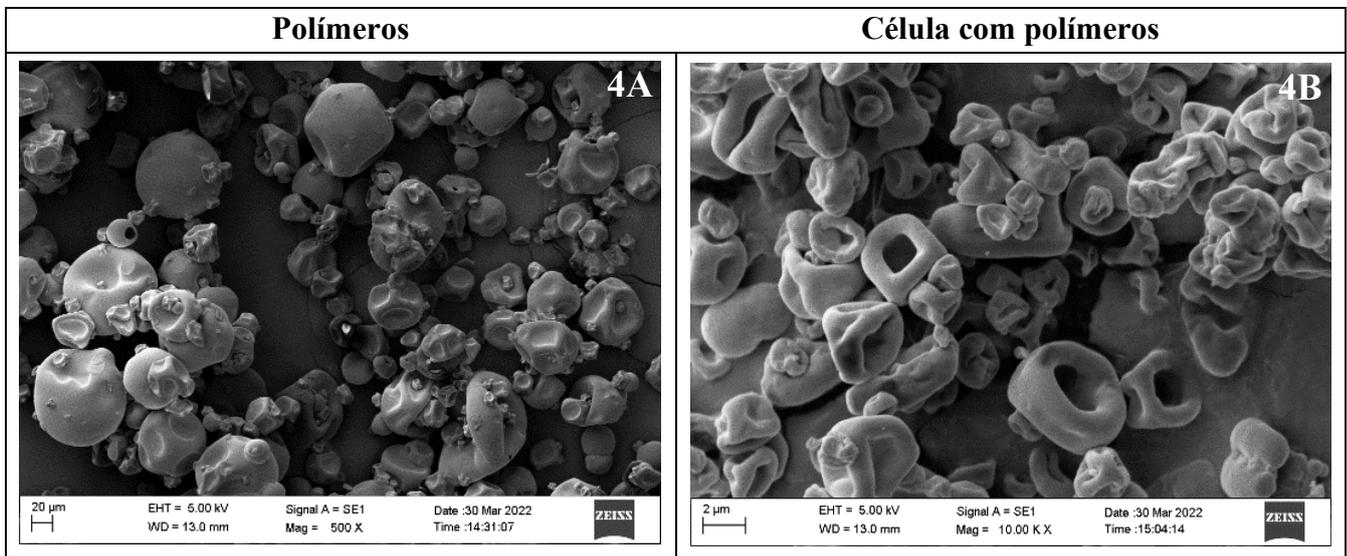
Figura 3.7 - Imagens MEV dos materiais de parede e das micropartículas de célula de *K. marxianus* que expressam atividade da  $\beta$ -galactosidase com diferentes biopolímeros: alginato de sódio, maltodextrina, goma arábica e proteína de soja isolada.



Continua.

*Capítulo 3 – Efeito de diferentes materiais de parede na formação de micropartículas de células de Kluyveromyces marxianus que expressam atividade de β-galactosidase*

Cont. Figura 3.7 - Imagens MEV dos materiais de parede e das micropartículas de célula de *K. marxianus* que expressam atividade da β-galactosidase com diferentes biopolímeros: alginato de sódio, maltodextrina, goma arábica e proteína de soja isolada.



Os polímeros (1A-Alginato de sódio, 2A-Goma Arábica, 3A-Maltodextrina e 4A-Proteína Isolada de Soja) foram amplificados 500 vezes (exceto alginato, amplificado 150 vezes), intensidade do feixe (EHT) 5 kV, distância entre a amostra e a lente igual ou inferior a (WD) 13 mm. Os polímeros com as células (1B-Alginato de sódio, 2B-Goma Arábica, 3B-Maltodextrina e 4B-Proteína Isolada de Soja) foram amplificados 10000 vezes, intensidade do feixe (EHT) 5 kV, distância entre a amostra e a lente (WD) igual a 13 mm.

As micropartículas formadas com revestimento de parede apresentaram um tamanho variado entre 2 e 12 μm, além das estruturas das micropartículas não apresentarem rupturas percebeu-se que existe um revestimento sobre a células visto que elas apresentam superfícies mais lisas que as células sem material de parede. Assim como as micropartículas formadas pela célula sem material de parede, as micropartículas revestidas também apresentaram decaimento da atividade enzimática após a secagem, contudo houve manutenção da atividade.

Os materiais de parede se apresentam de forma irregular, especialmente o alginato de sódio, a goma arábica e a maltodextrina. A proteína isolada de soja apresentou, de modo geral, aspecto mais esférico. Os materiais de parede aparentaram maior tamanho, visto que o aumento da imagem foi menor (150 vezes para o alginato e 500 vezes para os demais materiais) em comparação com as micropartículas (10.000 vezes). Após passarem pelo processo de secagem em bico atomizador 1,2 mm, observou-se estruturas padrões e menores.

Todas as amostras avaliadas, presentes nas Figuras 3.6 e 3.7, apresentaram características de pós secos por *spray drying* como formação de matriz irregular, formato indefinido, partículas deformadas, amolgadas e tamanhos variados. Essas características

*Capítulo 3 – Efeito de diferentes materiais de parede na formação de micropartículas de células de Kluyveromyces marxianus que expressam atividade de  $\beta$ -galactosidase*

---

também foram descritas por Di Battista et al. (DI BATTISTA et al., 2015) que avaliaram microscopia de fitoesteróis microencapsulados por *spray dryer* utilizando goma arábica, maltodextrina e tensoativos.

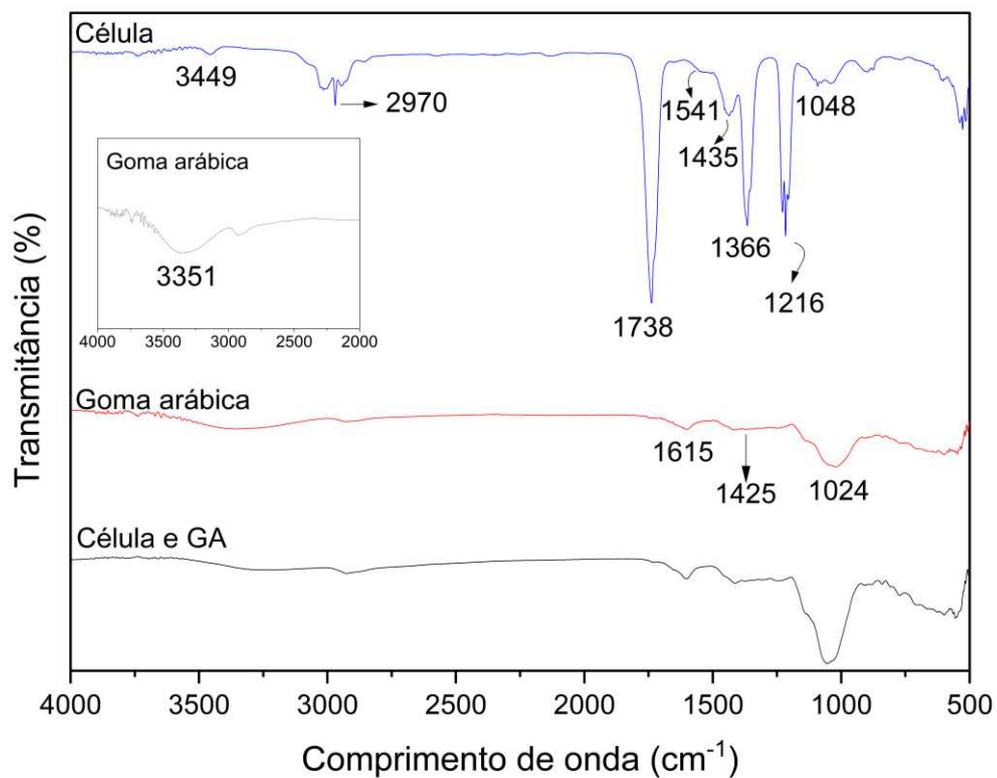
As células de *K. marxianus* microencapsuladas com alginato de sódio apresentaram aspecto visual mais esférico e com algumas partículas mais alongadas e achatadas, superfície ligeiramente mais lisa em comparação com as micropartículas formadas pelos outros materiais de parede, mas, com deformação em algumas partículas. Observa-se também que algumas partículas aparentam ter um tamanho maior que as outras visualmente, fato também possível de ser visto para as micropartículas formadas por goma arábica e maltodextrina (mas com menos intensidade do que para as amostras formadas com alginato de sódio). Isso pode ser devido à junção de mais de uma célula em uma mesma micropartícula.

Por outro lado, as células *K. marxianus* microencapsuladas com goma arábica e maltodextrina apresentaram aspectos mais semelhantes entre si. As características observadas para as células microencapsuladas com maltodextrina e goma arábica também foram observadas por Braga et al. (BRAGA et al., 2019). Para esses dois materiais de parede, observou-se, a formação de partículas mais homogêneas no que diz respeito ao tipo de partícula formada, muitas com aspecto colapsado. Por fim, nas imagens das células microencapsuladas com proteína isolada de soja foi possível observar estruturas mais heterogêneas, sendo que algumas partículas visualmente parecem ter aspecto mais liso e oco, enquanto na mesma imagem é possível observar estruturas mais esféricas colapsadas, sendo esse colapso aparentemente maior do que o observado para as amostras microencapsuladas com goma arábica e maltodextrina.

#### 3.3.4 Avaliação por espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier com reflexão total atenuada (FTIR-ATR) da microestrutura da célula de *K. marxianus* revestida com diferentes materiais de parede

Os espectros obtidos para os diferentes tratamentos bem como para os materiais de parede estão dispostos neste tópico. Espectros FTIR obtidos para célula *K. Marxianus*, goma arábica e a célula com goma arábica foram apresentados na Figura 3.8

Figura 3.8 - FTIR – ATR da célula, goma arábica e célula com goma arábica.



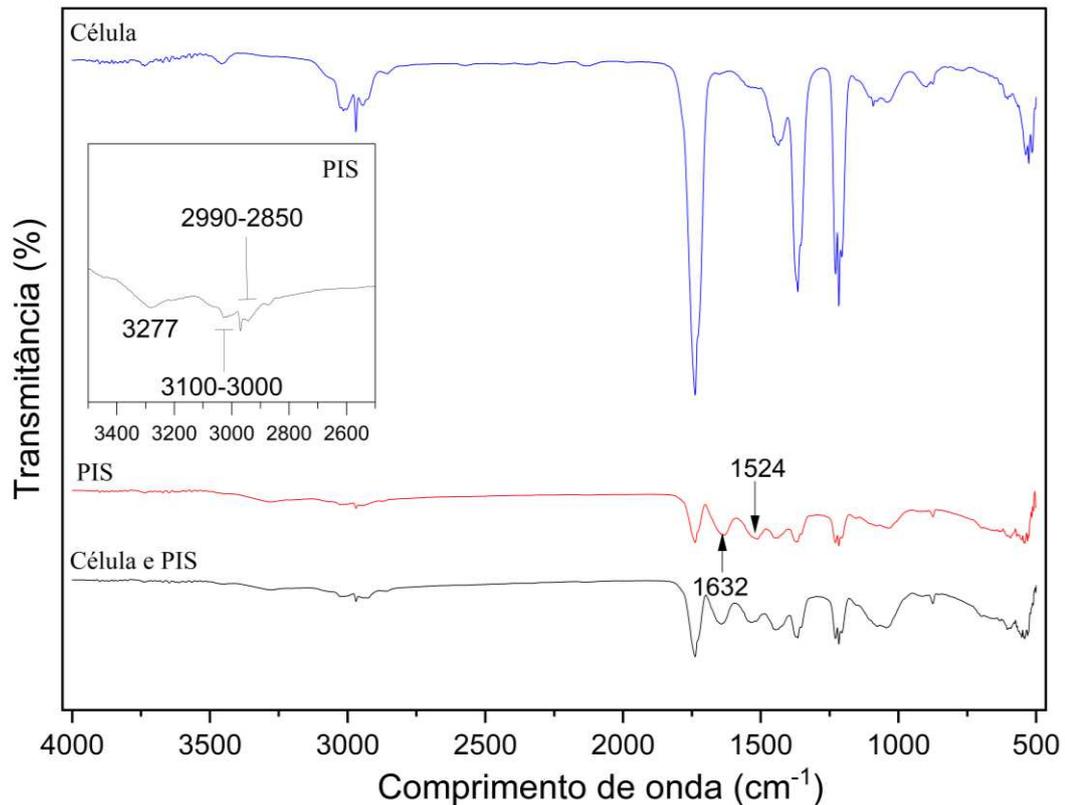
Observou-se bandas características para as células microbianas, como a presença de banda larga na região  $3.449\text{ cm}^{-1}$  que indica a presença de ligações do grupo O-H. Os picos na região de  $2.970\text{ cm}^{-1}$  mostram a existência de ligações C-H em aminoácidos e ácidos alifáticos presentes na membrana celular. Os picos observados em  $1.738\text{ cm}^{-1}$  revelam a vibração de estiramento de C=O em grupos éster encontrados em estruturas lipídicas. O pico que aparece em  $1.541\text{ cm}^{-1}$  está relacionado à presença de grupos carboxílicos na estrutura da parede celular. O pico na faixa de  $1.366\text{ cm}^{-1}$  representa a ligação C=O das vibrações simétricas de alongamento COO- presentes nas estruturas proteicas e as vibrações oscilantes de C-H<sub>2</sub> encontradas em lipídios. O pico observado em  $1.048\text{ cm}^{-1}$  exibe a presença de glucanos e o alongamento das ligações O-P-O e C-O-P na parede celular. Os resultados encontrados são similares aos descritos por Yücel et al. (YUCEL et al., 2020) que realizou a caracterização superficial e estrutural com FTIR da levedura recém-isolada *K. marxianus*.

Para a goma arábica observou-se a presença de banda larga na região  $3.351\text{ cm}^{-1}$  que indica a presença de ligações do grupo O-H, também possui a presença de duas bandas em  $1.615$  e  $1.425\text{ cm}^{-1}$  (agente de alongamento assimétrico e simétrico, COO-), as bandas de alongamento C-O em  $1.024\text{ cm}^{-1}$ , valores próximos foram encontrados por Sharifi et al.

*Capítulo 3 – Efeito de diferentes materiais de parede na formação de micropartículas de células de Kluyveromyces marxianus que expressam atividade de  $\beta$ -galactosidase*

(SHARIFI et al., 2021). Os espectros para a célula recoberta com a goma sobrepoem aos da goma pura, indicando que não houve formação de novas ligações após a microencapsulação. Os espectros FTIR obtidos para célula *K. Marxianus*, PIS e a célula com PSI foram apresentados na Figura 3.9.

Figura 3.9 - FTIR – ATR da célula, PIS e célula com PIS.

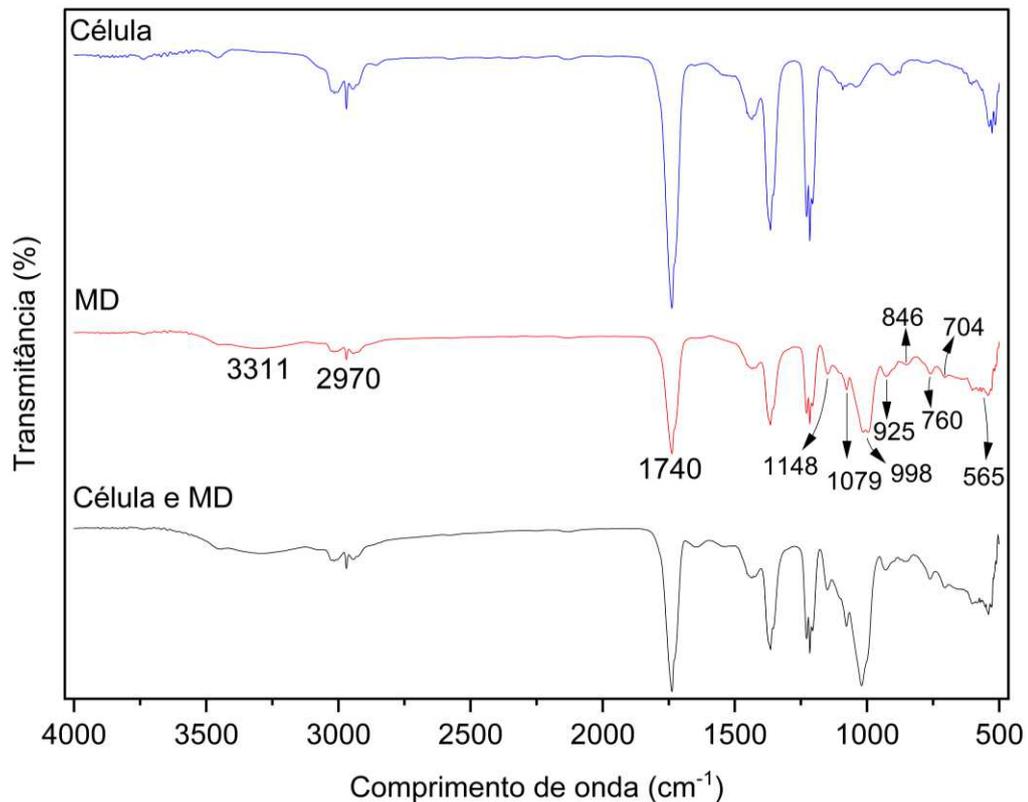


No espectro da PSI e célula recoberta com PSI apresentou uma completa semelhança nos picos, observou-se picos característicos do material de parede como a presença de amida I (grupo C=O, dentro da ligação peptídica) que ocorreu em 1.632 cm<sup>-1</sup>, amida II (de vibrações acopladas de  $\nu$ (C-N) e  $\delta$ (O-H)) em 1.524 cm<sup>-1</sup>, enquanto a banda em torno de 3.277 cm<sup>-1</sup> corresponde ao vibrações  $\nu$ (N-H) (sinal amplo devido ao hidrogênio). A região 3.110-3.000 cm<sup>-1</sup> está associada a vibrações  $\nu$ (C-H) de valência aromática originárias dos aminoácidos aromáticos na PSI, enquanto em 2.990-2.850 cm<sup>-1</sup> são atribuídas as vibrações alifáticas  $\nu$ (C-H). Valores semelhantes foram encontrados no estudo de Hadzieva et al. (HADZIEVA et al., 2017) que avaliaram a proteína isolada de soja como material de parede para micropartículas de *Lactobacillus casei* usando o método de secagem por *spray dryer*. A completa sobreposição entre os espectros do material de parede puro e a micropartícula sugerem que não houve

Capítulo 3 – Efeito de diferentes materiais de parede na formação de micropartículas de células de *Kluyveromyces marxianus* que expressam atividade de  $\beta$ -galactosidase

interação entre a célula e o material de parede. Os espectros FTIR obtidos para célula *K. Marxianus*, maltodextrina e a célula com maltodextrina foram apresentados na Figura 3.10.

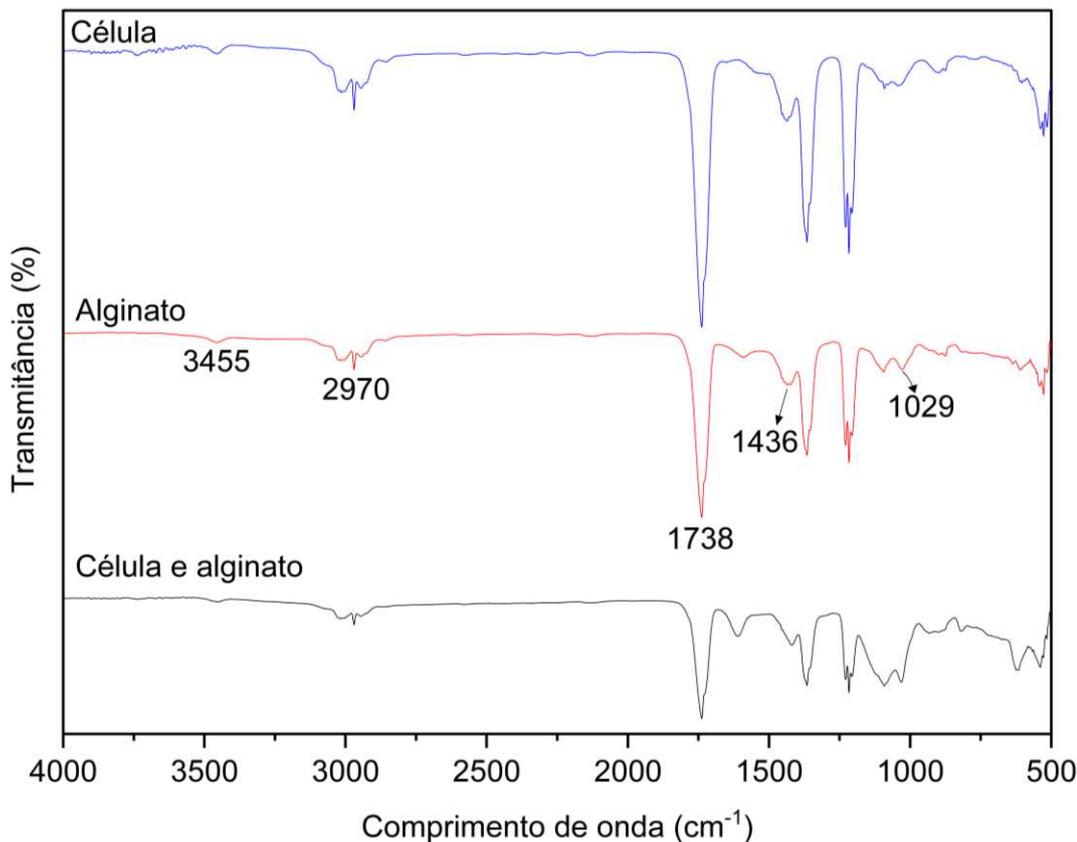
Figura 3.10 - FTIR – ATR da célula, maltodextrina (MD) e célula com MD.



Os picos encontrados foram semelhantes aos encontrados no estudo de Martins et al. (MARTINS et al., 2022) que avaliaram a maltodextrina como material de parede na microencapsulação de *Saccharomyces cerevisiae* e *Torulaspora delbrueckii* por *spray dryer*; o primeiro pico característico ocorre na frequência de 3.311 cm<sup>-1</sup> devido às ligações de hidrogênio (O-H), bandas na região de 2.970 cm<sup>-1</sup> (alongamento C-H); bandas em 1.740 cm<sup>-1</sup> (alongamento C=O); espectros observados em 1.148, 1.079 e 998 cm<sup>-1</sup> são referentes a alongamento C-O. Os outros espectros observados em 925, 846, 760, 704 e 565 cm<sup>-1</sup> estão correlacionados a vibrações do esqueleto do anel de piranose dos monômeros de glicose de maltodextrina. A célula revestida com maltodextrina apresentou o mesmo comportamento indicando que não houve a formação de novas ligações entre a célula e o material de recobrimento. Por fim, os espectros FTIR obtidos para célula *K. Marxianus*, alginato e a célula com alginato foram apresentados na Figura 3.11.

Capítulo 3 – Efeito de diferentes materiais de parede na formação de micropartículas de células de *Kluyveromyces marxianus* que expressam atividade de  $\beta$ -galactosidase

Figura 3.11 - FTIR – ATR da célula, alginato de sódio e célula com alginato.



O espectro do alginato mostrou picos características como bandas de absorção em 3.455  $\text{cm}^{-1}$  (vibrações de estiramento O-H), 2.970  $\text{cm}^{-1}$  (C-H vibrações de alongamento), 1.738  $\text{cm}^{-1}$  revelam a vibração de estiramento de C=O, 1436  $\text{cm}^{-1}$  (COO- vibrações simétricas de alongamento) e 1029  $\text{cm}^{-1}$  (vibração de alongamento C-O-C). Assim como as demais micropartículas, a célula envolta por alginato, apresentou características muito próximas ao material de parede usado.

Os resultados estão em conformidade com esperado, visto que os materiais utilizados para recobrimento foram inertes e não interagiram com a célula devido a ausência de picos diferentes nos espectros dos tratamentos. Além disso, todas as micropartículas formadas nos distintos tratamentos, apresentaram picos característicos do material de revestimento, sobrepondo-se as curvas dos materiais puros correspondentes. Deste modo, foi possível verificar que as micropartículas vistas por meio do MEV realmente estão recobertas pelos materiais de parede.

*Capítulo 3 – Efeito de diferentes materiais de parede na formação de micropartículas de células de Kluyveromyces marxianus que expressam atividade de β-galactosidase*

3.3.5 Determinação da atividade enzimática da β-galactosidase presente na célula de *K. marxianus* livre e microencapsulada

Os valores de atividade de β-galactosidase das células microencapsuladas, estão apresentados na Tabela 3.3.

Tabela 3.3 - Manutenção da atividade de β-galactosidase após a microencapsulação.

<b>Tratamento</b>	<b>Atividade inicial (U)</b>	<b>Atividade microcápsulas (U)</b>	<b>Manutenção da atividade (%)</b>
Tratamento 1	335,5 ± 0,5	65,5 ± 2,5	20%
Tratamento 2	286,5 ± 18,5	56,0 ± 12,0	20%
Tratamento 3	242,0 ± 34,5	27,0 ± 5,0	11%
Tratamento 4	268,5 ± 3,5	68,0 ± 1,0	25%
Tratamento 5	341 ± 13,5	69,3 ± 4,2	20%

**Tratamento 1:** célula e alginato; **tratamento 2:** célula e maltodextrina; **tratamento 3:** célula e goma arábica; **tratamento 4:** célula e proteína isolada de soja, **tratamento 5:** célula sem material de parede.

A atividade inicial apresentou variações, pois essas enzimas foram obtidas em diferentes bateladas e sem controle ambiental do fermentador. Para os parâmetros de secagem utilizados, a célula apresentou atividade enzimática, contudo apresentou uma queda significativa para todos os tratamentos realizados. O *spray dryer* é um método de baixo custo, elevada produtividade e simples, porém, a alta temperatura de operação causam a inativação das enzimas, sendo, portanto, responsável por uma parcela na redução da atividade enzimática após o processo de microencapsulação. A outra parcela do decaimento na atividade enzimática após a microencapsulação pode ser resultado da liberação lenta de células aprisionadas quando em solução tampão fosfato-hidróxido.

O tratamento que apresentou maior manutenção na atividade da β-galactosidase foi utilizando a proteína isolada de soja, como material de parede, cuja célula imobilizada apresentou 268,5 U e após a imobilização a atividade caiu para 68 U, uma manutenção de 25% em relação a atividade inicial. Ahn et al. (2013) estudaram a microencapsulação da enzima β-galactosidase extracelular por liofilização associada a emulsão (água/óleo/água) utilizando a proteína isolada de soja e maltodextrina como revestimento. Para esse estudo a retenção de atividade enzimática foi de 5,26% com proteína isolada de soja e de 1,12% com maltodextrina.

### *Capítulo 3 – Efeito de diferentes materiais de parede na formação de micropartículas de células de Kluyveromyces marxianus que expressam atividade de β-galactosidase*

---

Liofilização é um processo menos agressivo quando comparado ao *spray dryer* que utiliza altas temperaturas que podem desnaturar facilmente as enzimas, contudo no mencionado estudo a manutenção da atividade foi menor pois realizaram a imobilização da enzima extracelular sem agentes crioprotetores.

Estevinho et al. (ESTEVINHO et al., 2014a) microencapsularam a β-galactosidase de *E. coli* com diferentes polímeros (goma arábica, quitosana modificada, quitosana, alginato de cálcio e alginato de sódio) em *spray dryer* sob as seguintes condições: vazão de solução 4 mL/min, vazão de ar 32 m<sup>3</sup>/h, pressão do ar 6,5 bar, temperatura de entrada 115 °C e temperatura de saída de 58 °C ± 2,5 °C. Para essas condições a atividade enzimática em relação a atividade inicial foi de 37%, 20%, 20%, 13% e 0% para goma arábica, quitosana modificada, alginato de cálcio, alginato de sódio e quitosana, respectivamente. Pode-se observar que parâmetros como a fonte da enzima, sua síntese (enzima intracelular ou extracelular) e o método de imobilização impactam diretamente na manutenção da atividade enzimática.

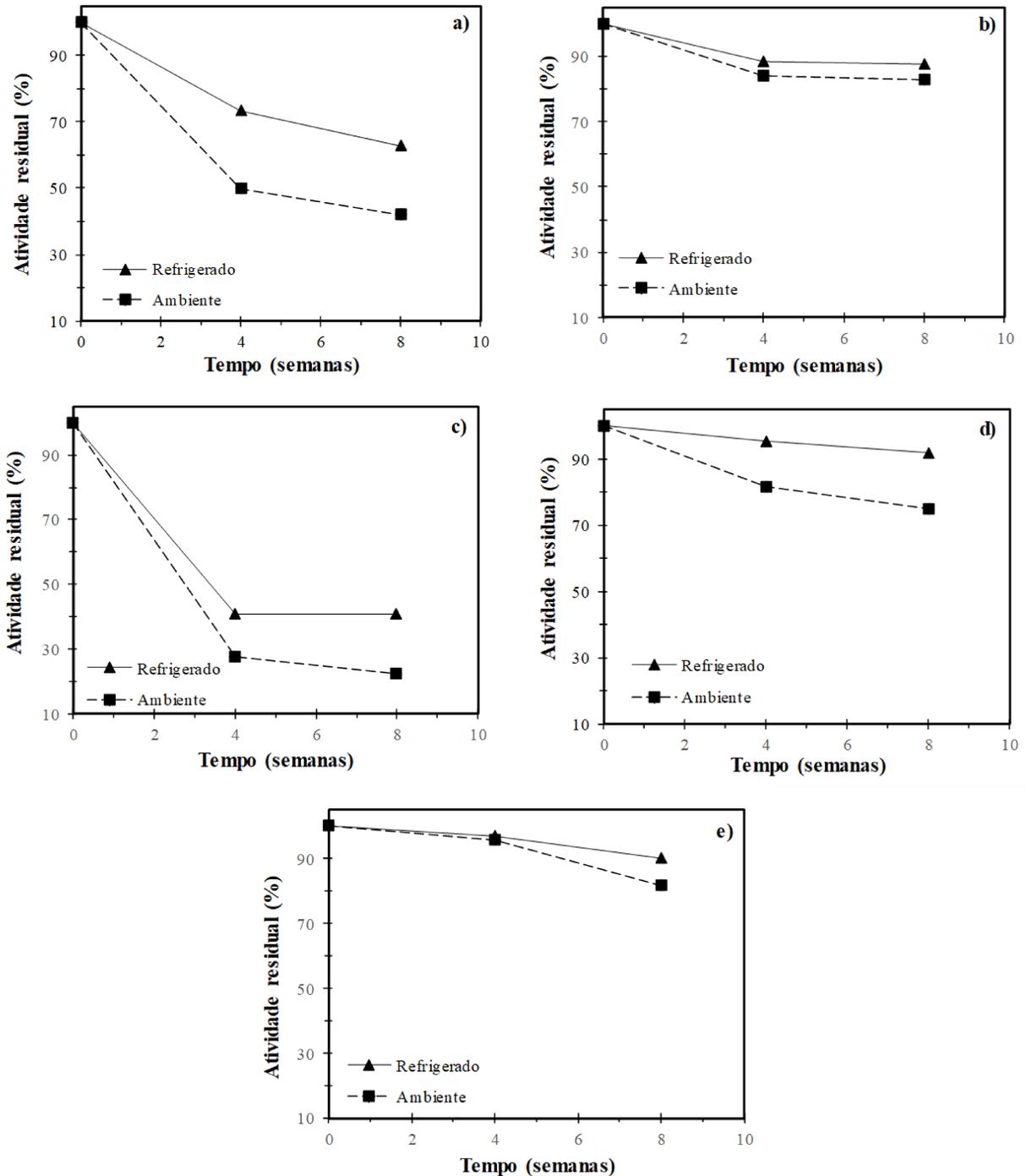
A célula seca em *spray-dryer* (tratamento 5) apresentou a manutenção da atividade assim como micropartículas revestidas com materiais de paredes, isso mostra que a célula por si só, é capaz de proteger a enzima β-galactosidase durante o processo de secagem.

#### 3.3.6 Estudo da estabilidade ao armazenamento da célula de *K. marxianus* microencapsulada que expressa atividade de β-galactosidase

A célula de *K. marxianus* microencapsulada que continha atividade de β-galactosidase foi armazenada durante oito semanas na forma de pó, à 4°C e 25°C. Em forma ressuspensa foi armazenada durante 30 dias à 4°C. Na Figura 3.12 está ilustrada a manutenção da estabilidade frente ao armazenamento da micropartícula em pó, relacionando a atividade residual e o tempo de armazenagem para cada tipo de micropartícula formada.

Capítulo 3 – Efeito de diferentes materiais de parede na formação de micropartículas de células de *Kluyveromyces marxianus* que expressam atividade de  $\beta$ -galactosidase

Figura 3.12 - Estabilidade ao armazenamento da  $\beta$ -galactosidase microencapsulada armazenada à 4°C e 25°C, utilizando diferentes materiais de parede com o mesmo núcleo: a) alginato de sódio; b) maltodextrina; c) goma arábica, d) proteína isolada de soja e e) célula sem material de parede.



De acordo com Figura 3.12 é possível observar que durante as oito semanas, as micropartículas formadas, utilizando maltodextrina, proteína isolada de soja e a célula sem o material de parede, mantiveram a atividade residual superior a 80%, para ambos os

*Capítulo 3 – Efeito de diferentes materiais de parede na formação de micropartículas de células de *Kluyveromyces marxianus* que expressam atividade de  $\beta$ -galactosidase*

---

armazenamentos. Já para as micropartículas formadas com alginato de sódio e goma arábica, a manutenção da atividade foi inferior a 80% para ambos os tratamentos.

Para todas as micropartículas formadas, a estocagem refrigerada apresentou melhores resultados quando comparado com a estocagem à temperatura ambiente, visto que sob refrigeração reações de degradação são mais lentas. Contudo a diferença entre a atividade final dos pós armazenados refrigerados e armazenados à temperatura ambiente na oitava semana não foi superior a 20,62%, o que indica que o armazenamento pode ser feito sob temperatura ambiente sem grandes prejuízos.

A célula sem revestimento apresentou maior perda de atividade entre a quarta e a oitava semana para ambos os tipos de armazenamentos, isso se deve ao fato da exposição direta da célula a interações com o ambiente, as partículas sem revestimentos apresentaram uma queda contínua da atividade durante os 60 dias avaliados; diferente dos demais tratamentos que após as quatro primeiras semanas de quedas apresentaram uma maior estabilidade independentemente do tipo de estocagem.

Observa-se que para as micropartículas formadas a partir da maltodextrina, a perda total da atividade durante a estocagem foi inferior aos demais tratamentos, sendo de 12,5% e 16,96% para a micropartículas armazenadas sob refrigeração e temperatura ambiente, respectivamente. Em contrapartida a célula sem revestimento também apresentou ótimos resultados de manutenção de atividade. Kim et al. (KIM et al., 1999) avaliaram a microencapsulação da enzima  $\beta$ -galactosidase, por meio de lipossomas, usando o método de liofilização e reportaram retenção de 96%, 95% e 87% da atividade após 15, 30 e 60 dias, respectivamente, sendo armazenados a 17°C.

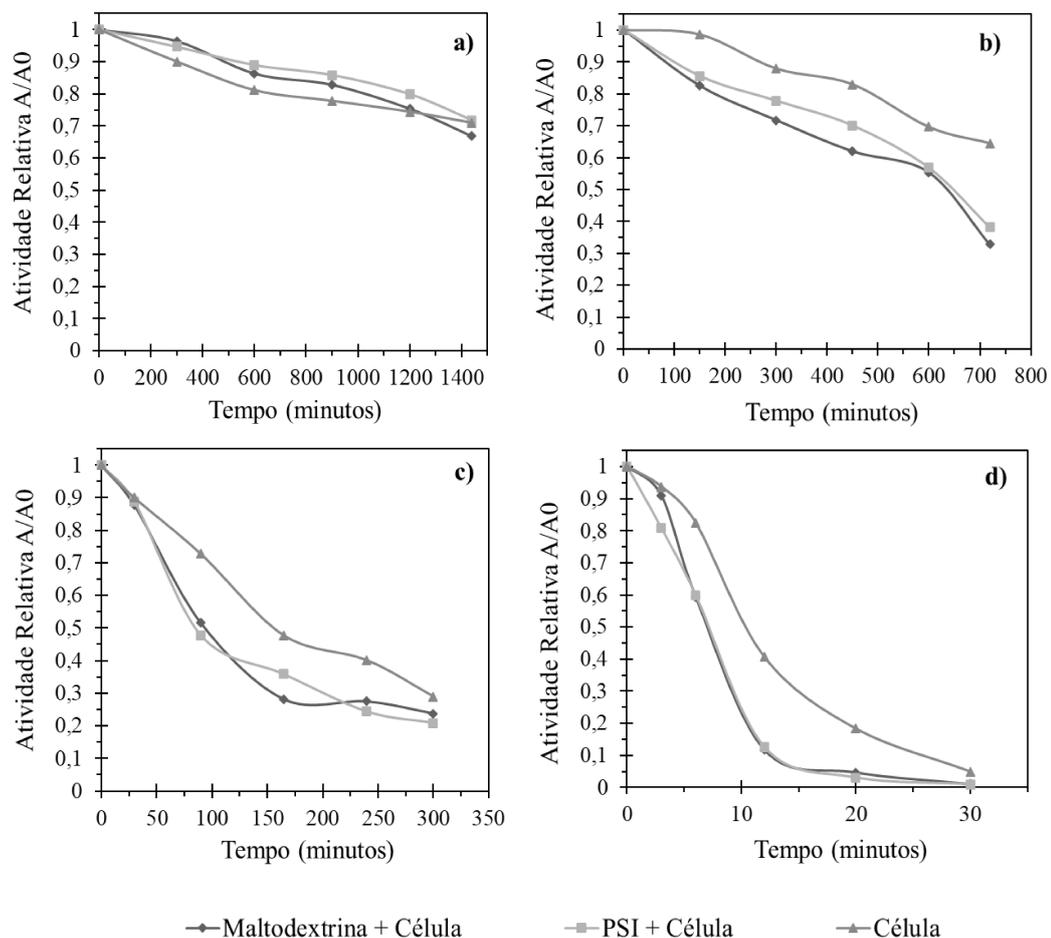
Foi observado a manutenção da estabilidade frente ao armazenamento das micropartículas ressuspensas ao término dos 30 dias para cada tipo de micropartícula formada. Os resultados obtidos foram de 45,04; 90,18; 31,48; 76,47 e 77,29 % para as células revestidas com alginato, maltodextrina, goma arábica, PIS e célula sem revestimento, respectivamente. Mesmo ressuspensas as micropartículas são capazes de preservar a atividade enzimática, sendo as micropartículas formadas de maltodextrina, PIS e célula sem revestimento as que apresentaram maior estabilidade assim como na forma em pó.

Capítulo 3 – Efeito de diferentes materiais de parede na formação de micropartículas de células de *Kluyveromyces marxianus* que expressam atividade de  $\beta$ -galactosidase

3.3.7 Estudo da estabilidade térmica da célula de *K. marxianus* microencapsulada que expressa atividade de  $\beta$ -galactosidase

As propriedades das enzimas são influenciadas pela temperatura, deste modo é importante avaliar a estabilidade da  $\beta$ -galactosidase conforme a variação da temperatura. A avaliação da estabilidade térmica foi realizada com os tratamentos que apresentaram maiores manutenção de atividade e melhor estabilidade ao armazenamento: célula e maltodextrina, célula e PIS e célula seca sem material de parede. As atividades relativas em função do tempo de incubação para a temperatura de 30, 35, 40 e 50 °C estão ilustradas na Figura 3.13, onde é observado como a temperatura exerce uma grande influência sobre a estabilidade da  $\beta$ -galactosidase oriunda da *K. marxianus*.

Figura 3.13- Perfis de inativação térmica a 30 °C (a), 35 °C (b), 40 °C (c) e 50° C (d) em pH 7,0 para  $\beta$ -galactosidase presente na célula de *K. marxianus* imobilizada com maltodextrina, PIS e sem material de parede.



*Capítulo 3 – Efeito de diferentes materiais de parede na formação de micropartículas de células de Kluyveromyces marxianus que expressam atividade de  $\beta$ -galactosidase*

---

Para a temperatura 50 °C houve uma redução significativa de atividade, maior que 90% para todos os tratamentos, após 30 minutos de incubação. Para 40 °C houve redução significativa, maior que 70% para todos os tratamentos, após 5 horas. Para 35 °C a inativação enzimática foi um pouco mais lenta, a enzima sofreu inativação térmica somente após 12 horas de incubação, excluindo-se as micropartículas formadas apenas por células que mantiveram 64% da sua atividade após as 12 horas. Para a temperatura de 30 °C a enzima manteve cerca de 70% de sua atividade inicial após 24 horas de incubação, para as micropartículas estudadas. Como foi observado, o processo de inativação térmica ocorre rapidamente com o aumento de temperatura devido à desnaturação da enzima e conseqüentemente sua inativação, logo em temperaturas amenas a enzima apresenta maior estabilidade.

Modelos de desativação térmica foram ajustados aos resultados obtidos para cada temperatura da atividade enzimática residual em função do tempo de incubação para cada tratamento, conforme descrito no item 3.2.2.9. Os ajustes foram realizados usando o *software* Statistica® 7.0 pelo método numérico de Levenberg-Marquardt, com a finalidade de determinar os parâmetros cinéticos (HENLEY; SADANA, 1985; MORÉ, 1978).

O modelo de desativação térmica de primeira ordem (Equação 3.4) se ajustou aos resultados obtidos para todas as temperaturas e para os três tratamentos avaliados: célula e maltodextrina; célula e PIS e célula sem material de parede. Na Tabela 3.4 são apresentados os parâmetros cinéticos de desativação de primeira ordem, a soma dos quadrados dos desvios e a análise de significância, utilizando o teste t de Student, adotando como parâmetros significativos os que apresentaram níveis de significância menores que 10% para a célula *K. marxianus* microencapsuladas.

*Capítulo 3 – Efeito de diferentes materiais de parede na formação de micropartículas de células de Kluyveromyces marxianus que expressam atividade de  $\beta$ -galactosidase*

Tabela 3.4 – Parâmetros de ajustes do modelo de desativação térmica de primeira ordem aos dados experimentais para  $\beta$ -galactosidase presente na célula de *K. marxianus* imobilizada com diferentes materias de parede (maltodextrina, PIS) e sem material de parede.

<b>Tratamento</b>	<b>T (°C)</b>	<b><math>k_d</math> (min<sup>-1</sup>)</b>	<b>Valor - p</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b><math>\sum (v - \bar{v})^2</math></b>
Maltodextrina	30	0,000245	0,000018	0,96	0,003
Maltodextrina	35	0,001188	0,000070	0,94	0,015
Maltodextrina	40	0,006184	0,000133	0,96	0,021
Maltodextrina	50	0,109907	0,003519	0,93	0,069
PIS	30	0,000201	0,000009	0,97	0,002
PIS	35	0,001011	0,000126	0,93	0,017
PIS	40	0,006195	0,000066	0,97	0,015
PIS	50	0,115830	0,001112	0,96	0,040
Célula	30	0,000263	0,000015	0,94	0,003
Célula	35	0,000533	0,000152	0,92	0,009
Célula	40	0,004014	0,000001	0,99	0,003
Célula	50	0,067425	0,001483	0,94	0,053

Todos os resultados obtidos foram significativos com nível de confiança de 90% e apresentaram coeficiente de determinação ( $R^2$ ) superiores a 0,92 e os valores da soma do quadrado dos desvios foram inferiores a 0,069, desta forma o ajuste foi considerado adequado. Como esperado, quanto menor a temperatura, menor o valor de  $k_d$  obtido, ou seja, maior a estabilidade da enzima e por meio das constantes de desativação térmica foram calculados os tempos de meia vida conforme a Equação 3.5 para cada temperatura e tratamento; os resultados estão dispostos na Tabela 3.5.

*Capítulo 3 – Efeito de diferentes materiais de parede na formação de micropartículas de células de Kluyveromyces marxianus que expressam atividade de β-galactosidase*

Tabela 3.5 - Valores de  $k_d$  e tempos de meia-vida calculados pelo modelo de primeira ordem de desativação térmica para β-galactosidase presente na célula de *K. marxianus* imobilizada com maltodextrina.

Tratamento	T (°C)	$k_d$ (min <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>	$t_{1/2}$ (min)
Maltodextrina	30	0,000245	0,96	2.831,8
Maltodextrina	35	0,001188	0,94	583,6
Maltodextrina	40	0,006184	0,96	112,1
Maltodextrina	50	0,109907	0,93	6,3
PIS	30	0,000201	0,97	3.446,5
PIS	35	0,001011	0,93	685,6
PIS	40	0,006195	0,97	111,9
PIS	50	0,115830	0,96	6,0
Célula	30	0,000263	0,94	2.637,2
Célula	35	0,000533	0,92	1.300,8
Célula	40	0,004014	0,99	172,7
Célula	50	0,067425	0,94	10,9

A enzima incubada a 30 °C apresentou o maior tempo de meia vida para todos os tratamentos conforme o esperado, sendo que o tratamento com PIS apresentou o maior tempo de meia vida (3.446,5 minutos), seguida do tratamento com maltodextrina (2.831,8 minutos) e finalmente a célula sem material de parede (2.637,2 minutos). A 35 °C a célula sem revestimento apresentou maior tempo de meia vida (1.300,8 minutos), apresentando uma diferença de 716,4 minutos a mais que o tempo de meia vida das micropartículas com maltodextrina e 615,2 minutos a mais que as micropartículas contendo PIS. A 40 °C observou-se uma redução considerável da atividade enzimática, pois o tempo de meia-vida foi de 172,7; 111,9 e 112,1 minutos para célula, célula e maltodextrina e célula e PSI respectivamente. Para 50 °C a queda foi rápida da atividade, sendo o tempo de meia-vida de apenas de 10,9; 6,3 e 6,0 minutos para célula, célula e maltodextrina e célula e PSI respectivamente.

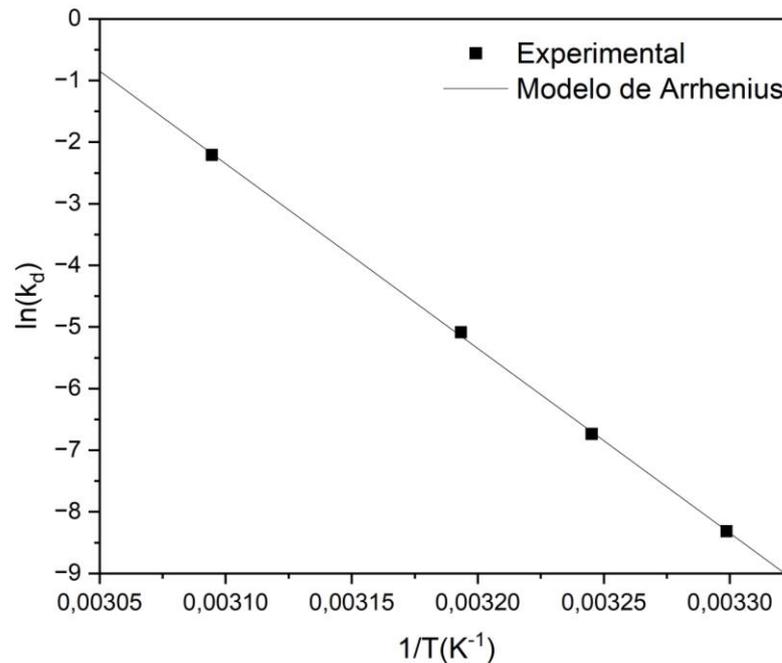
Em todas as temperaturas avaliadas não houve grande diferença para os tempos de meia vida entre os diferentes tratamentos estudados, a célula sem material de revestimento foi capaz de preservar a atividade enzimática sem dificuldades.

Com base na equação de Arrhenius na forma linearizada (Equação 3.6), utilizando o *software* Origin® 2023 plotou-se os dados de  $\ln(k_d)$  em função do inverso da temperatura. O coeficiente angular da regressão dos dados corresponde ao termo da equação de Arrhenius  $-\frac{E_a}{R}$ .

Capítulo 3 – Efeito de diferentes materiais de parede na formação de micropartículas de células de *Kluyveromyces marxianus* que expressam atividade de  $\beta$ -galactosidase

Deste modo obteve-se a Figura 3.14 e a Equação 3.9 para a micropartícula formada com maltodextrina.

Figura 3.14 - Ajuste do modelo de Arrhenius aos dados experimentais (valores de  $k_d$ ) para micropartículas de células com maltodextrina.

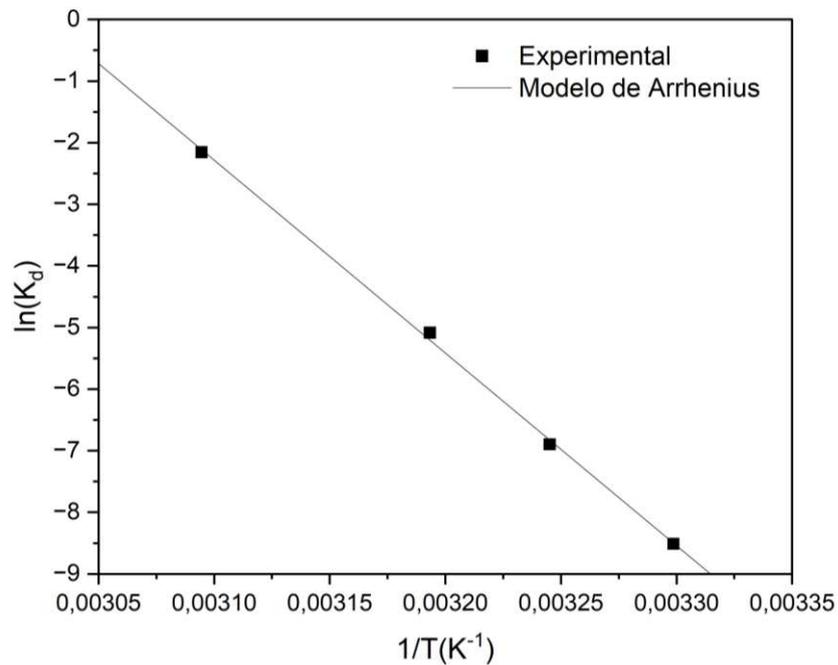


$$\ln(k_d) = -29999,28 \cdot \frac{1}{T} + 90,65 \quad \text{Equação 3.7}$$

O ajuste linear do modelo de Arrhenius (Equação 3.8) apresentou um coeficiente de determinação de 0,99 e a  $E_a$  calculada através do coeficiente angular foi de 59,61 kcal/mol. A Figura 3.15 e a Equação 3.10 foram obtidas após o ajuste do modelo de Arrhenius para a micropartícula formada com PIS.

Capítulo 3 – Efeito de diferentes materiais de parede na formação de micropartículas de células de *Kluyveromyces marxianus* que expressam atividade de  $\beta$ -galactosidase

Figura 3.15 - Ajuste do modelo de Arrhenius aos dados experimentais (valores de  $k_d$ ) para micropartículas de células com proteína isolada de soja

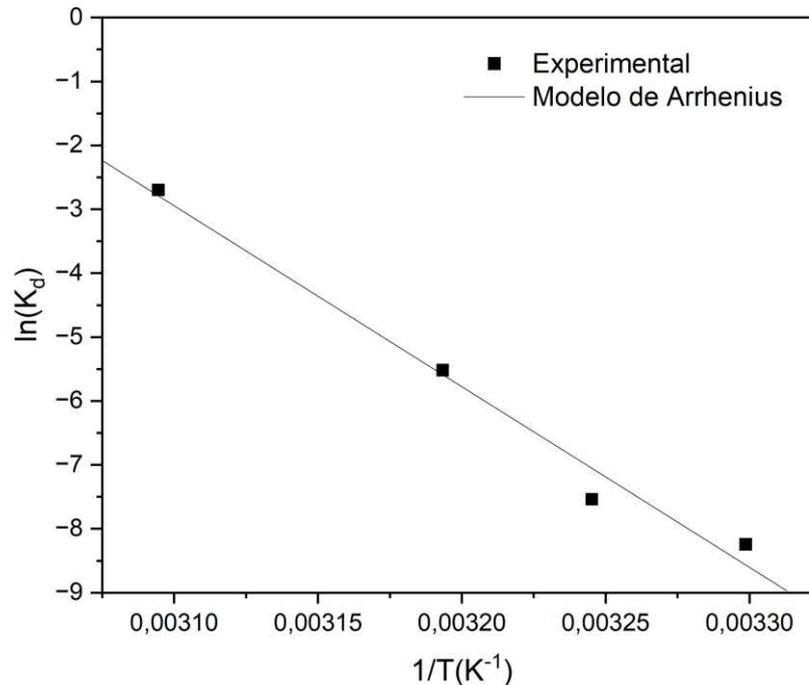


$$\ln(k_d) = -31312,13 \cdot \frac{1}{T} + 94,79 \quad \text{Equação 3.8}$$

O ajuste linear ao modelo de Arrhenius apresentou um coeficiente de determinação de 0,99 e a  $E_a$  calculada foi de 62,22 kcal/mol. A Equação 3.11 e a Figura 3.16 foram obtidas após o ajuste do modelo de Arrhenius para a micropartícula formada apenas com a célula de *K. marxianus*.

Capítulo 3 – Efeito de diferentes materiais de parede na formação de micropartículas de células de *Kluyveromyces marxianus* que expressam atividade de  $\beta$ -galactosidase

Figura 3.16 - Ajuste do modelo de Arrhenius aos dados experimentais (valores de  $k_d$ ) para micropartículas de células sem material de parede.



$$\ln(k_d) = -28310,02 \cdot \frac{1}{T} + 94,82 \quad \text{Equação 3.9}$$

O ajuste linear do modelo de Arrhenius apresentou um coeficiente de determinação de 0,98 e  $E_a$  calculada foi de 56,25 kcal/mol. Comparando  $E_a$  dos tratamentos avaliados verifica-se que o tratamento com PIS apresentou a maior energia de ativação e o tratamento sem material de parede apresentou a menor energia de ativação para inativação térmica. Deste modo, o tratamento com PIS é mais estável a oscilações de temperaturas visto que quanto maior a  $E_a$  mais energia é necessária para dar início a reações de desativação térmica, consequentemente quanto maior a  $E_a$  maior é a estabilidade térmica. Contudo não houve grandes diferenças entre os valores de  $E_a$  dos tratamentos avaliados, deste modo, todos apresentaram estabilidade térmica semelhantes.

Sousa et al. (SOUSA et al., 2021) avaliaram a estabilidade térmica da enzima  $\beta$ -galactosidase solúvel obtida de *K. marxianus*, para 30 °C com tempo de meia vida de 3387,0 minutos e  $E_a$  calculada de 64,13 kcal/mol. Em comparação com este estudo os tempos de meia vida obtidos para 30 °C foram próximos, 2831,8; 3446,5 e 2637,2 kcal/mol e  $E_a$  iguais a 59,61;

*Capítulo 3 – Efeito de diferentes materiais de parede na formação de micropartículas de células de Kluyveromyces marxianus que expressam atividade de  $\beta$ -galactosidase*

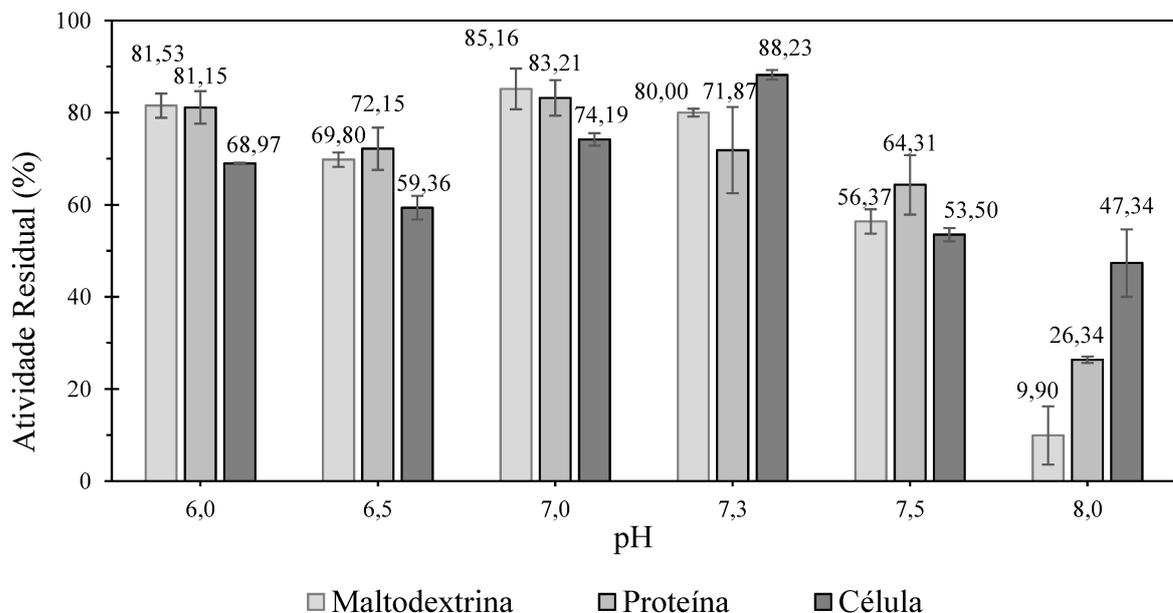
62,22; e 56,25 kcal/mol para maltodextrina, PIS e célula sem material de parede, respectivamente.

A partir dos resultados apresentados é possível afirmar que a enzima  $\beta$ -galactosidase produzida a partir da *K. marxianus* é mais estável em temperaturas amenas ( $30 \approx 35$  °C) e pouco estável a altas temperaturas mesmo microencapsuladas com agentes encapsulantes, apresentando resultados próximos aos encontrados para a enzima solúvel.

### 3.3.8 Estudo da estabilidade ao pH da célula de *K. marxianus* microencapsulada que expressa atividade de $\beta$ -galactosidase

O pH é um fator externo de grande importância quando se avalia a estabilidade de enzimas, ele exerce influência direta na estabilidade catalítica. Ao se conhecer a estabilidade enzimática em relação ao pH, é possível armazenar de maneira correta, bem como aplicar a enzima em processos industriais. Na Figura 3.17 está ilustrada a atividade residual (%) em relação a faixa de pH avaliada (6,0; 6,5; 7,0; 7,3; 7,5 e 8,0), a 30 °C por 12 horas para as células imobilizadas em maltodextrina, PIS e célula sem material de parede.

Figura 3.17 - Influência do pH na estabilidade da  $\beta$ -galactosidase em tampão fosfato de potássio-hidróxido de sódio em diferentes valores de pH 6,0; 6,5; 7,0; 7,3; 7,5 e 8,0 a 30 °C.



É possível observar que a enzima  $\beta$ -galactosidase presente na célula imobilizada com maltodextrina se apresentou estável em pH 6,0; 7,0 e 7,3 mantendo sua atividade superior a

*Capítulo 3 – Efeito de diferentes materiais de parede na formação de micropartículas de células de Kluyveromyces marxianus que expressam atividade de β-galactosidase*

---

80%; já a enzima presente na célula imobilizada com PIS apresentou maior estabilidade em pH 6,0 e 7,0 com atividade superior à 80%; em pH 6,0 e 7,3 ocorreu manutenção da atividade contudo inferior a 80%. A enzima β-galactosidase presente na célula imobilizada sem material de parede apresentou maior estabilidade em pH 7,3 mantendo a atividade superior a 80%. Em pH 8,0 todas apresentaram atividade residual abaixo de 50%. Szczodrak (SZCZODRAK, 2000) avaliou a estabilidade ao pH da β-galactosidase livre e imobilizada de *K. fragilis*, incubada a 30 °C por 12 horas, nessas condições a enzima reteve mais de 90% da atividade inicial quando em pH 6,5 a 7,0 e reteve no máximo 40% quando em pH acima de 7,5; ao afastar da neutralidade do pH a enzima perde sua estabilidade.

Desse modo, a estabilidade da enzima β-galactosidase produzida a partir da cepa *K. marxianus*, mostrou maior estabilidade em pH neutro, entre 7,0 e 7,3. Conforme Gékas e Lopez-Leiva (GEKAS; LOPEZ-LEIVA, 1985) enzimas oriundas de *K. marxianus* operam em pH próximo à neutralidade, o que condiz com a faixa de operação encontrada no presente estudo, mesmo em micropartículas formadas sem materiais de parede.

### 3.4 CONCLUSÕES

É possível microencapsular a célula *Kluyveromyces marxianus* por *spray drying* e manter a atividade enzimática da β-galactosidase, criando micropartículas que apresentam estabilidade ao armazenamento, estabilidade térmica em temperaturas amenas e estabilidade em pH na faixa da neutralidade, mesmo em micropartículas sem revestimento com polímeros. A utilização da levedura seca que expressa atividade enzimática apresenta vantagens, visto que não é necessário polímeros para sua microencapsulação, sequer há a necessidade de extrair a enzima da célula, nem mesmo realizar a sua purificação reduzindo, portanto, os custos de produção. Além disso a célula sem o material de parede apresentou resultados muito próximos as micropartículas formadas com revestimento, e alto rendimento de secagem (60%).

As micropartículas formadas com MD10 e PIS na concentração de 2%, mantém a atividade enzimática, bem como estabilidade térmica em temperaturas amenas, estabilidade em faixa de pH neutro e ao armazenamento, contudo não há grandes diferenças quando não é utilizados esses materiais. Já a goma arábica e o alginato de sódio não se mostram os melhores materiais para essa aplicação.

Apesar da enzima β-galactosidase ter sido amplamente estudada por vários autores, não tem sido avaliada a viabilidade de microencapsular o microrganismo que expressa atividade

*Capítulo 3 – Efeito de diferentes materiais de parede na formação de micropartículas de células de *Kluyveromyces marxianus* que expressam atividade de  $\beta$ -galactosidase*

---

enzimática de  $\beta$ -galactosidase, deste modo, os resultados obtidos com este estudo apresentam-se inovadores e promissores, demonstrando que as células de *Kluyveromyces marxianus* microencapsuladas podem ser uma alternativa para o uso da enzima  $\beta$ -galactosidase em sua forma extracelular líquida, almejando assim obter metodologias para o uso na indústria de alimentos, farmacêutica e proteção ao meio ambiente.

### 3.5 REFERÊNCIAS

ALVARADO-RAMÍREZ, Lynette; ROSTRO-ALANIS, Magdalena; RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ, José; CASTILLO-ZACARÍAS, Carlos; SOSA-HERNÁNDEZ, Juan Eduardo; BARCELÓ, Damià; IQBAL, Hafiz M. N.; PARRA-SALDÍVAR, Roberto. Exploring current tendencies in techniques and materials for immobilization of laccases – A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 181, p. 683–696, 2021. DOI: 10.1016/J.IJBIOMAC.2021.03.175.

AMERI, Mahmoud; MAA, Yuh Fun. **Spray Drying of Biopharmaceuticals: Stability and Process Considerations**. <https://doi.org/10.1080/03602550600685275>, [S. l.], v. 24, n. 6, p. 763–768, 2007. DOI: 10.1080/03602550600685275.

BAO, Jie; KOUMATSU, Kenichi; FURUMOTO, Keiji; YOSHIMOTO, Makoto; FUKUNAGA, Kimitoshi; NAKAO, Katsumi. Deactivation kinetics of immobilized glucose oxidase for production of calcium gluconate in an external loop airlift bioreactor. **Biochemical Engineering Journal**, [S. l.], v. 22, n. 1, p. 33–41, 2004. DOI: 10.1016/J.BEJ.2004.08.001.

BRAGA, Alinne B. A. C.; COSTA, Cleiver J. M.; POMELLA, Alan W. V.; RIBEIRO, Eloízio J.; SANTOS, Líbia D.; ZOTARELLI, Marta F. Evaluation of lethality temperature and use of different wall materials in the microencapsulation process of *Trichoderma asperellum* conidia by spray drying. **Powder Technology**, [S. l.], v. 347, p. 199–206, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2019.02.037>.

CAI, Y. Z.; CORKE, H. Production and Properties of Spray-dried. **Journal of Food Science**, [S. l.], v. 65, n. 3600, p. 1248–1252, 2000.

CAL, Krzysztof; SOLLOHUB, Krzysztof. Spray drying technique. I: Hardware and process parameters. **Journal of pharmaceutical sciences**, [S. l.], v. 99, n. 2, p. 575–586, 2010. DOI: 10.1002/JPS.21886.

CANO-CHAUCA, Milton; STRINGHETA, P. C.; RAMOS, A. M.; CAL-VIDAL, J. Effect of the carriers on the microstructure of mango powder obtained by spray drying and its functional characterization. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, [S. l.], v. 6, n. 4, p. 420–428, 2005. DOI: 10.1016/J.IFSET.2005.05.003.

CHIRIFE, Jorge; DEL PILAR BUERA, María. **Water activity, water glass dynamics, and the control of microbiological growth in foods**. <http://dx.doi.org/10.1080/10408399609527736>, [S. l.], v. 36, n. 5, p. 465–513, 2009. DOI: 10.1080/10408399609527736.

DANTAS, Adriana; VERRUCK, Silvani; PRUDENCIO, Elane Schwinden. Ciência e Tecnologia de Leite e Produtos Lácteos Sem Lactose. **Ciência e Tecnologia de Leite e Produtos Lácteos Sem Lactose**, [S. l.], p. 1–388–416, 2019. DOI: 10.22533/AT.ED.121191102.

DEKKER, Peter J. T.; KOENDERS, Damiet; BRUINS, Maaike J. Lactose-Free Dairy Products: Market Developments, Production, Nutrition and Health Benefits. **Nutrients** **2019**, Vol. 11, Page 551, [S. l.], v. 11, n. 3, p. 551, 2019. DOI: 10.3390/NU11030551.

DESAI, K. G. H.; PARK, H. J. Preparation of cross-linked chitosan microspheres by spray drying: Effect of cross-linking agent on the properties of spray dried microspheres. **Journal of Microencapsulation**, [S. l.], v. 22, n. 4, p. 377–395, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1080/02652040500100139>.

DI BATTISTA, Carla Agustina; CONSTENLA, Diana; RAMÍREZ-RIGO, María Verónica; PIÑA, Juliana. The use of arabic gum, maltodextrin and surfactants in the microencapsulation of phytosterols by spray drying. **Powder Technology**, [S. l.], v. 286, p. 193–201, 2015. DOI: 10.1016/J.POWTEC.2015.08.016.

*Capítulo 3 – Efeito de diferentes materiais de parede na formação de micropartículas de células de *Kluyveromyces marxianus* que expressam atividade de  $\beta$ -galactosidase*

ESTEVINHO, Berta N.; DAMAS, Ana M.; MARTINS, Pedro; ROCHA, Fernando. Microencapsulation of  $\beta$ -galactosidase with different biopolymers by a spray-drying process. **Food Research International**, [S. l.], v. 64, p. 134–140, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2014.05.057>.

FALLEIROS, Larissa. N. S. S.; CABRAL, Bruna. V.; RESENDE, Miriam. M.; RIBEIRO, Eloisio. J. **Estudo da produção de  $\beta$ -galactosidase por fermentação de permeado de soro de leite com *Kluyveromyces marxianus***. [S. l.], p. 994–1001, 2015. DOI: 10.5151/CHEMENG-COBEQ2014-0675-24488-146957.

FELLOWS, P. **Food processing technology: Principles and Practice**. 2. ed. England.

FISCHER, Janaína; GUIDINI, Carla Zanella; FALLEIROS, Larissa N. S. S.; RESENDE, Miriam Maria De; CARDOSO, Vicelma Luiz; RIBEIRO, Eloízio Júlio. Optimization and modeling of lactose hydrolysis in a packed bed system using immobilized  $\beta$ -galactosidase from *Aspergillus oryzae*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, [S. l.], v. 85–86, p. 178–186, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcatb.2012.09.008>.

FOGLIANO, Rosana Rodrigues Figueira; BOHOMOL, Elena; SCHVEITZER, Mariana Cabral; COCA, Kelly Pereira; ABRÃO, Ana Cristina Freitas de Vilhena. Quality management in Human Milk Banks: a scope review. **Revista Brasileira de Enfermagem**, [S. l.], v. 73, n. suppl 6, 2020. DOI: 10.1590/0034-7167-2019-0640.

GEA NIRO RESEARCH LABORATORY. **GEA Niro Analytical Methods**. 2015.

GEKAS, V.; LOPEZ-LEIVA, M. Hydrolysis of lactose: a literature review. **Process biochemistry**, [S. l.], v. 20, n. 1, 1985.

GHARSALLAOUI, Adem; ROUDAUT, Gaëlle; BENEY, Laurent; CHAMBIN, Odile; VOILLEY, Andrée; SAUREL, Rémi. Properties of spray-dried food flavours microencapsulated with two-layered membranes: Roles of interfacial interactions and water. **Food Chemistry**, [S. l.], v. 132, n. 4, p. 1713–1720, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.03.028>.

GHARSALLAOUI, Adem; ROUDAUT, Gaëlle; CHAMBIN, Odile; VOILLEY, Andrée; SAUREL, Rémi. Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. **Food Research International**, [S. l.], v. 40, n. 9, p. 1107–1121, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2007.07.004>.

GROSOVÁ, Zuzana; ROSENBERG, Michal; REBROŠ, Martin. Perspectives and applications of immobilised  $\beta$ -galactosidase in food industry - A review. **Czech Journal of Food Sciences**, [S. l.], v. 26, n. 1, p. 1–14, 2008. DOI: 10.17221/1134-cjfs.

HADZIEVA, Jasmina et al. Lactobacillus casei encapsulated in soy protein isolate and alginate microparticles prepared by spray drying. **Food Technology and Biotechnology**, [S. l.], v. 55, n. 2, 2017. DOI: 10.17113/ftb.55.02.17.4991.

HENLEY, James P.; SADANA, Ajit. Categorization of enzyme deactivations using a series-type mechanism. **Enzyme and Microbial Technology**, 1985. DOI: 10.1016/0141-0229(85)90013-4.

KIM, Chong Kook; CHUNG, Hey Soon; LEE, Mi Kyung; CHOI, Lee Na; KIM, Moon Hee. Development of dried liposomes containing  $\beta$ -galactosidase for the digestion of lactose in milk. **International Journal of Pharmaceutics**, [S. l.], v. 183, n. 2, p. 185–193, 1999. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(99\)00115-5](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(99)00115-5).

MAISCHBERGER, Thomas; NGUYEN, Thu Ha; SUKYAI, Prakit; KITTL, Roman; RIVA, Sergio; LUDWIG, Roland; HALTRICH, Dietmar. Production of lactose-free galacto-oligosaccharide mixtures: comparison of two cellobiose dehydrogenases for the selective oxidation of lactose to lactobionic acid. **Carbohydrate Research**, [S. l.], v. 343, n. 12, p. 2140–2147, 2008. DOI: 10.1016/j.carres.2008.01.040.

*Capítulo 3 – Efeito de diferentes materiais de parede na formação de micropartículas de células de Kluyveromyces marxianus que expressam atividade de  $\beta$ -galactosidase*

MANERA, Ana Paula; ORES, Joanna da Costa; RIBEIRO, Vanessa Amaral; BURKERT, Carlos André Veiga; KALIL, Susana Juliano. Optimization of the Culture Medium for the Production of  $\beta$ -Galactosidase from *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082. **Food Technology and Biotechnology**, [S. l.], v. 46, n. 1, p. 66–72, 2008.

MARTINS, Pâmela Mynsen Machado; BATISTA, Nádia Nara; SANTOS, Líbia Diniz; DIAS, Disney Ribeiro; SCHWAN, Rosane Freitas. Microencapsulation by spray drying of coffee epiphytic yeasts *Saccharomyces cerevisiae* CCMA 0543 and *Torulaspora delbrueckii* CCMA 0684. **Brazilian Journal of Microbiology**, [S. l.], v. 53, n. 3, p. 1565–1576, 2022. DOI: 10.1007/S42770-022-00776-4/FIGURES/4.

MASTERS, K. (Keith). Spray drying handbook. Burnt Mill, Harlow, Essex, England: New York : **Longman Scientific & Technical** ;;Wiley, 1991.

MOEJES, S. N.; VISSER, Q.; BITTER, J. H.; VAN BOXTEL, A. J. B. Closed-loop spray drying solutions for energy efficient powder production. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, [S. l.], v. 47, p. 24–37, 2018. DOI: 10.1016/J.IFSET.2018.01.005.

MORÉ, Jorge J. The Levenberg-Marquardt algorithm: Implementation and theory. In: [s.l: s.n.]. DOI: 10.1007/bfb0067700.

MOVAHEDPOUR, Ahmad; AHMADI, Nahid; GHALAMFARSA, Farideh; GHESMATI, Zeinab; KHALIFEH, Masoomah; MALEKSABET, Amir; SHABANINEJAD, Zahra; TAHERI-ANGANEH, Mortaza; SAVARDASHTAKI, Amir.  $\beta$ -Galactosidase: From its source and applications to its recombinant form. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, [S. l.], v. 69, n. 2, p. 612–628, 2022. DOI: 10.1002/BAB.2137.

MUHAMMED ALSHANBERI, Asim; AHMED AL-SHAERI, Majed; AHMED ANSARI, Shakeel; VITOR FARAGO, Paulo. Overviewing the Application of  $\beta$ -Galactosidase “Immobilized on Nanoparticles” in Dairy Industries. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, [S. l.], v. 64, p. 2021, 2021. DOI: 10.1590/1678-4324-2021180747.

MUJUMDAR, Arun S. Industrial Spray Drying Systems. **Handbook of Industrial Drying**, [S. l.], p. 221–256, 2014. DOI: 10.1201/B17208-21/INDUSTRIAL-SPRAY-DRYING-SYSTEMS-ARUN-MUJUMDAR.

MUJUMDAR, Professor Arun S. A Review of: “Water Activity: Theory and Applications to Food” Edited by L.B. Rockland and L.R. Beuchat Marcel Dekker, N.Y., 1987, 404 p. <http://dx.doi.org/10.1080/07373939008959922>, [S. l.], v. 8, n. 4, p. 883–884, 2007. DOI: 10.1080/07373939008959922.

MUKUNDAN, Soumya; MELO, Jose Savio; SEN, Debasis; BAHADUR, Jitendra. Enhancement in  $\beta$ -galactosidase activity of *Streptococcus lactis* cells by entrapping in microcapsules comprising of correlated silica nanoparticles. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [S. l.], v. 195, n. June, p. 111245, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2020.111245>.

NAMALDI, Aysegul; ÇALIK, Pinar; ULUDAG, Yusuf. Effects of Spray Drying Temperature and Additives on the Stability of Serine Alkaline Protease Powders. <https://doi.org/10.1080/07373930600961108>, [S. l.], v. 24, n. 11, p. 1495–1500, 2007. DOI: 10.1080/07373930600961108.

NÉMETH, A; SZABÓ, E; KASZA, Gy; ÓZSVÁRI, L. Development of lactose free, functional dairy foods based on consumer survey **Keywords: functional dairy products lactose intolerance consumer survey yogurt**. [S. l.], v. 7, n. 1, p. 26–29, 2020. DOI: 10.47833/2020.1.AGR.006.

NGUYEN, Quoc Duy; DANG, Thanh Thuy; NGUYEN, Thi Van Linh; NGUYEN, Thi Thuy Dung; NGUYEN, Nhu Ngoc. Microencapsulation of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) anthocyanins: Effects of different carriers on selected physicochemical properties and

*Capítulo 3 – Efeito de diferentes materiais de parede na formação de micropartículas de células de *Kluyveromyces marxianus* que expressam atividade de  $\beta$ -galactosidase*

**antioxidant activities of spray-dried and freeze-dried powder.** <https://doi.org/10.1080/10942912.2022.2044846>, [S. l.], v. 25, n. 1, p. 359–374, 2022. DOI: 10.1080/10942912.2022.2044846.

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

NUMANOĞLU, Yasemin; SUNGUR, Sibel.  $\beta$ -Galactosidase from *Kluyveromyces lactis* cell disruption and enzyme immobilization using a cellulose–gelatin carrier system. **Process Biochemistry**, [S. l.], v. 39, n. 6, p. 705–711, 2004. DOI: 10.1016/S0032-9592(03)00183-3.

PANESAR, Parmjit S.; KUMARI, Shweta; PANESAR, Reeba. Potential applications of immobilized  $\beta$ -galactosidase in food processing industries. **Enzyme Research**, 2010. DOI: 10.4061/2010/473137.

PINHEIRO, R.; BELO, I.; MOTA, M. Growth and beta-galactosidase activity in cultures of *Kluyveromyces marxianus* under increased air pressure. **Letters in applied microbiology**, [S. l.], v. 37, n. 6, p. 438–442, 2003. DOI: 10.1046/J.1472-765X.2003.01429.X.

PRESTES, Amanda Alves; HELM, Cristiane Vieira; ESMERINO, Erick Almeida; SILVA, Ramon; PRUDENCIO, Elane Schwinden. Conventional and alternative concentration processes in milk manufacturing: a comparative study on dairy properties. **Food Science and Technology**, [S. l.], v. 42, 2022. DOI: 10.1590/FST.08822.

RODRÍGUEZ-RESTREPO, Yeimy A.; GIRALDO, Gloria I.; RODRÍGUEZ-BARONA, Sneyder. Solubility as a fundamental variable in the characterization of wall material by spray drying of food components: Application to microencapsulation of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*. **Journal of Food Process Engineering**, [S. l.], v. 40, n. 6, p. e12557, 2017. DOI: 10.1111/JFPE.12557.

SANTIAGO, Patrícia A.; MARQUEZ, Líbia D. S.; CARDOSO, Vicelma L.; RIBEIRO, Eloízio J. Estudo da produção de beta-galactosidase por fermentação de soro de queijo com *Kluyveromyces marxianus*. **Food Science and Technology**, [S. l.], v. 24, n. 4, p. 567–572, 2004. DOI: 10.1590/S0101-20612004000400015.

SHARIFI, Sohrab; REZAZAD-BARI, Mahmoud; ALIZADEH, Mohammad; ALMASI, Hadi; AMIRI, Saber. Use of whey protein isolate and gum Arabic for the co-encapsulation of probiotic *Lactobacillus plantarum* and phytosterols by complex coacervation: Enhanced viability of probiotic in Iranian white cheese. **Food Hydrocolloids**, [S. l.], v. 113, p. 106496, 2021. DOI: 10.1016/J.FOODHYD.2020.106496.

SOUSA, Carla Cristina De; RESENDE, Miriam Maria De; FALLEIROS, Larissa Nayhara Soares Santana; RIBEIRO, Eloízio Júlio. **Synthesis and Immobilization of  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces marxianus* Using Ion Exchange Resin.** <https://home.liebertpub.com/ind>, [S. l.], v. 17, n. 1, p. 27–37, 2021. DOI: 10.1089/IND.2020.0007.

SZCZODRAK, J. Hydrolysis of lactose in whey permeate by immobilized  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. **Journal of Molecular Catalysis - B Enzymatic**, [S. l.], v. 10, n. 6, 2000. DOI: 10.1016/S1381-1177(00)00187-9.

TREISTER-GOLTZMAN, Y.; FRIGER, M.; PELEG, R. Does primary lactase deficiency reduce bone mineral density in postmenopausal women: A systematic review and meta-analysis. **Osteoporosis International** 2018 29:11, [S. l.], v. 29, n. 11, p. 2399–2407, 2018. DOI: 10.1007/S00198-018-4635-1.

YUCEL, Hande Gunan; AKSU, Zumriye; YALCINKAYA, Gulsah Busra; KARATAY, Sevgi Ertugrul; DONMEZ, Gonul. A comparative investigation of lithium(I) biosorption

*Capítulo 3 – Efeito de diferentes materiais de parede na formação de micropartículas de células de Kluyveromyces marxianus que expressam atividade de  $\beta$ -galactosidase*

---

properties of *Aspergillus versicolor* and *Kluyveromyces marxianus*. **Water Science and Technology**, [S. l.], v. 81, n. 3, 2020. DOI: 10.2166/WST.2020.126.

ZINGONE, Fabiana; BUCCI, Cristina; IOVINO, Paola; CIACCI, Carolina. **Consumption of milk and dairy products: Facts and figures. Nutrition** (Burbank, Los Angeles County, Calif.), [S. l.], v. 33, p. 322–325, 2017. DOI: 10.1016/J.NUT.2016.07.019.

## **PROPOSTAS PARA TRABALHOS FUTUROS**

- Estudar o reuso das microcápsulas e avaliar a aplicação delas;
- Avaliar o efeito da concentração do material de parede na manutenção da atividade enzimática, para materiais que apresentaram maiores rendimentos de secagem
- Estudar a aplicação de agentes estabilizantes na formulação das micropartículas para avaliação da vida de prateleira do produto;
- Comparar o processo de microencapsulação por spray drying com secagem por liofilização.

## ANEXO A

**CERTIFICADO DE ANÁLISE LINHAGEM DO MICRORGANISMO  
KLUYVEROMYCES MARXIANUS**



Coleção de Culturas Tropical  
www.cct.org.br

Fundação André Tosello  
www.fat.org.br  
R. Latino Coelho, 1301 Pq. Taquaral  
CEP 13087-010 Campinas SP  
Fone/Fax: (19) 3242-7022  
Fax: (19) 3242-7827  
CNPJ 46.126.322/0001-82

**CERTIFICADO**

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

CCT	Microrganismo	Referência	Lote
4086	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	ATCC 46537	T06/1/H

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

*Microrganismo de 1ª passagem*

Referência CCT: OS 130208

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

  
M<sup>ª</sup> Josiane Conti  
Coleção de Culturas CCT/FAT  
E-mail: [josi@fat.org.br](mailto:josi@fat.org.br)

Campinas, 06 de Maio de 2013.

## ANEXO B

### ESPECIFICAÇÃO TÉCNICA PERMEADO DE SORO



LACTOSUL INDÚSTRIA DE LATICÍNIOS LTDA

Rod. BR 158 - s/nº - Km 88 - Zona Rural - Piranhas/GO -  
CEP: 76230-000 Tel/Fax.: (64) 3665 7200  
SIF: 2305

[qualidade@laticinioscentrooeste.com.br](mailto:qualidade@laticinioscentrooeste.com.br)

Laudo Nº 001792



**Produto:** Permeado de Soro de leite em Pó  
**Marca:** Centro Oeste  
**Cliente:** Universidade Federal de Uberlândia

**Data de Fabricação:** 12/11/2021

**Data de Validade:** 12/11/2022

**Data de Emissão:** 24/11/2021

**Lote:** 620121121

**Qtde:** 10 kg

**Aspecto:** Pó homogêneo e isento de materiais estranhos, grumos e pontos pretos visíveis.

**Embalagem Primária:** Sacos de polietileno termossoldados

**Embalagem Secundária:** Sacos Kraft (02 folhas) costurados

**Peso Líquido:** 25 Kg

Análise	Método	Resultados	Unidade
Textura	FIL 99A: 1987	Característico	-
Aroma	FIL 99A: 1987	Característico	-
Sabor	FIL 99A: 1987	Característico	-
Umidade	IN 68/2006	1,99	%
Proteína	IN 68/2006	1,50	%
Gordura	IN 68/2006	0,00	%
Cinzas	IN 68/2006	4,66	%
Acidez	IN 68/2006	0,13	% de ácido láctico
Lactose	Cálculo	91,85	%
PH ( Sol. 10% a 20°C )	Adolfo Lutz	5,92	Faixa
Cont. Total Mesófilas	Petrifilm	1,0 x 10 <sup>2</sup>	UFC/g
Coliformes Total	Petrifilm	< 1,0 x 10 <sup>1</sup>	UFC/g
Coliformes Fecal	Petrifilm	< 1,0 x 10 <sup>1</sup>	UFC/g
<i>Staphylococcus</i> coag. posit.	Petrifilm	< 1,0 x 10 <sup>1</sup>	UFC/g
Salmonella*	IN 62/2003	Ausente em 250g	UFC/250g

Aprovado: Sim (  )

Não (  )

Elisiane do Silveiro Aguiar  
Analista de Garantia da Qualidade

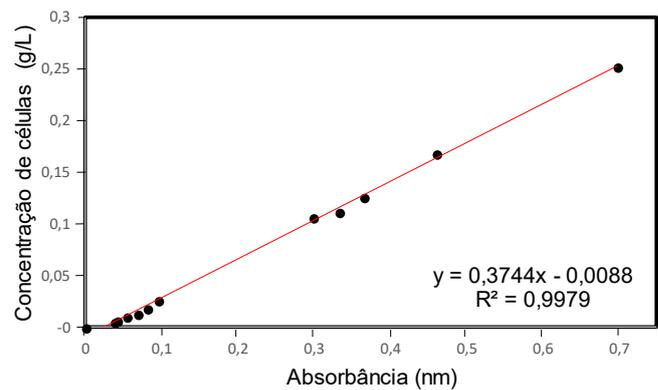
## APÊNDICE A

### DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CÉLULAS

A concentração celular foi obtida através da massa seca, coletando-se 100 mL do caldo fermentado do reator em seguida centrifugou-se sob refrigeração (12000rpm, 4 °C, 10 minutos), o sobrenadante foi descartado, o decantado foi ressuspensionado em água deionizada e colocadas em estufa não convectiva a uma temperatura de 80 °C até que sua massa permanecesse constante. A massa seca era obtida pela diferença entre a massa final e a massa do recipiente.

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

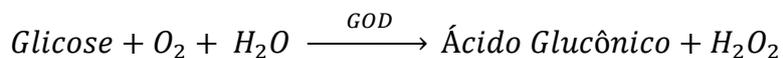
Absorbância	Concentração de células (g/L)
0,698	0,25279
0,462	0,16800
0,366	0,12600
0,333	0,11200
0,300	0,10600
0,096	0,02641
0,081	0,01746
0,069	0,01324
0,054	0,01060
0,041	0,00663
0,038	0,00530
0	0



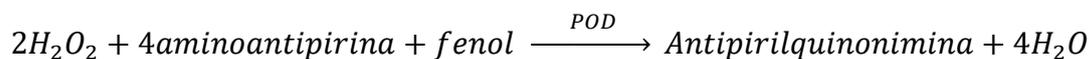
## APÊNDICE B

### DETERMINAÇÃO DE GLICOSE

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



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



O kit Glicose Liquiform é composto por dois reagentes, sendo o Reagente 1 apresentado pronto para uso utilizando metodologia enzimática de grande especificidade analítica, de simples e fácil aplicação em laboratório e o Reagente 2 destinado a calibração e determinação do padrão.

O método pode ser utilizado em técnica manual e é facilmente aplicável em analisadores semi-automáticos e automáticos capazes de medir com exatidão a absorvância entre 490 e 520 nm.

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

Tabela – Teste glicose-oxidase.

	<b>Branco</b>	<b>Teste</b>	<b>Padrão</b>
<b>Amostra</b>	--	0,02 mL	--
<b>Padrão</b>	--	--	0,02 mL
<b>Reagente 1</b>	2,0 mL	2,0 mL	2,0 mL

Misturar vigorosamente e incubar em banho-maria a  $37 \pm 2$  °C durante 10 minutos. Após esse tempo, as amostras eram lidas as absorvâncias a 505nm em espectrofotômetro,

considerando como branco o Reagente 1. Com os valores de absorvância em função da absorvância da amostra padrão (Equação) obtêm-se a concentração de glicose.

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

Deste modo foi possível obter a concentração de glicose por meio do kit Labtest.