



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Faculdade de Engenharia Química

Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos



LARISSA THAYNARA RAMOS DE MELO

SECAGEM DE CÉLULAS DE *Kluyveromyces marxianus* POR *SPRAY*
***DRYING* VISANDO OBTENÇÃO DE UM BIOCATALISADOR QUE EXPRESSA**
ATIVIDADE DE β -GALACTOSIDASE

Patos de Minas - MG

2025

LARISSA THAYNARA RAMOS DE MELO

SECAGEM DE CÉLULAS DE *Kluyveromyces marxianus* POR *SPRAY DRYING* VISANDO OBTENÇÃO DE UM BIOCATALISADOR QUE EXPRESSA ATIVIDADE DE β -GALACTOSIDASE

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

Orientadora: Carla Zanella Guidini

Coorientadora: Marta Fernanda Zotarelli

Patos de Minas - MG

2025

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

- M528s
2025 Melo, Larissa Thaynara Ramos de, 1997-
 Secagem de células de *Kluyveromyces marxianus* por Spray Drying
 visando obtenção de um biocatalisador que expressa atividade de β -
 Galactosidase [recurso eletrônico] / Larissa Thaynara Ramos de Melo. -
 2025.
- Orientadora: Carla Zanella Guidini.
 Coorientadora: Marta Fernanda Zotarelli.
 Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos.
 Modo de acesso: Internet.
 Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.di.2026.5007>
 Inclui bibliografia.
 Inclui ilustrações.
1. Tecnologia de alimentos. I. Guidini, Carla Zanella, 1983-, (Orient.).
 II. Zotarelli, Marta Fernanda, 1985-, (Coorient.). III. Universidade Federal
 de Uberlândia. Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos.
 IV. Título.

CDU: 664

Nelson Marcos Ferreira
Bibliotecário-Documentalista - CRB-6/3074



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Engenharia de Alimentos				
Defesa de:	Dissertação de Mestrado Acadêmico n. 8/2025 - PPGEA				
Data:	Doze de agosto de dois mil e vinte e cinco	Hora de início:	14:05	Hora de encerramento:	16:40
Matrícula do Discente:	42312EAL010				
Nome do Discente:	Larissa Thaynara Ramos de Melo				
	Secagem de células de <i>Kluyveromyces marxianus</i> por <i>spray drying</i> visando obtenção de um biocatalisador que expressa atividade de β -galactosidase				
Área de concentração:	Engenharia de Alimentos				
Linha de pesquisa:	Processos Biotecnológicos				

Reúne-se por webconferência (Microsoft Teams) a Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos, assim composta: Carla Zanella Guidini (Orientadora/Presidente), Carla Cristina de Sousa (Membro UFU), Eloizio Júlio Ribeiro (Membro UFU) e Franciny Campos Schmidt (Membro Externo).

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 aos examinadores, 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 12/08/2025, às 16:39, 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 **Eloizio Julio Ribeiro, Professor(a) do Magistério Superior**, em 12/08/2025, às 16:53, 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 **Carla Cristina de Sousa, Usuário Externo**, em 12/08/2025, 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 **Franciny Campos Schmidt, Usuário Externo**, em 12/08/2025, às 17:01, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador 6583857 e o código CRC 55F0A81A.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus e à espiritualidade por me conduzirem até aqui, iluminando meu caminho mesmo nos momentos mais desafiadores. À minha querida avó, que mesmo não estando mais entre nós, continua me motivando por meio do laço de amor e apoio que permanece vivo. Agradeço também a mim mesma, por ter suportado as dores, enfrentado os medos e persistido, mesmo quando a vontade era desistir. Olhar para trás e perceber o quanto cresci e evolui é, sem dúvida, uma das maiores recompensas dessa jornada.

À minha mãe, minha base, agradeço por todo apoio, incentivo e amor incondicional que me impulsionam a seguir em frente. À toda minha família, agradeço por todo o amor, paciência e incentivo. Agradeço também, imensamente, ao meu companheiro de vida, que mesmo tendo que lidar com esse furacão de emoções que vivi, sempre foi meu lado racional e acreditou em mim quando nem eu mesma conseguia, obrigada por fazer de tudo para me apoiar e estar ao meu lado. Sou eternamente grata.

Agradeço especialmente às minhas colegas Dra. Carla Sousa e Me. Adrielle Ribeiro pelos ensinamentos compartilhados comigo e apoio ao longo de toda essa jornada.

À minha orientadora, Carla Guidini e Coorientadora Marta Zotarelli, agradeço a orientação, paciência e confiança no meu trabalho. Agradeço aos técnicos de laboratório e aos funcionários pelos ensinamentos, suporte técnico e oportunidades de aprendizado.

Sou grata à Universidade Federal de Uberlândia (UFU) pela oportunidade, pela infraestrutura e pelo fornecimento de materiais essenciais para a realização desta pesquisa. Agradeço também à empresa Lactosul Indústria de Laticínios LTDA pela doação de materiais que contribuíram significativamente para o desenvolvimento do trabalho.

Por fim, aos amigos que souberam respeitar meu silêncio e meu sumiço, que me apoiaram com palavras, abraços e mensagens de carinho, deixo meu agradecimento eterno.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	10
LISTA DE SÍMBOLOS	11
INTRODUÇÃO	12
Objetivos	14
Estrutura do trabalho	15
CAPÍTULO 1 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
1.1 Produtos lácteos	16
1.2 Intolerância à lactose	16
1.2.1 Fisiopatologia	16
1.2.2 Manejo nutricional	17
1.2.3 Produtos sem lactose no mercado atual	18
1.3 Produção enzimática	19
1.4 Permeado do soro de leite e Soro de leite como substrato para a fermentação da produção de enzimas	23
1.5 Reticulação Enzimática e agente carreador	27
1.6 Secagem por <i>spray drying</i>	29
2 REFERÊNCIAS	33
CAPÍTULO 2 - RECUPERAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE β -GALACTOSIDASE DE DIFERENTES FONTES MICROBIANAS	46
2.1 INTRODUÇÃO	48
2.2 METODOLOGIA	50
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES	50
2.3.1 Produção da β -galactosidase	50
2.3.2 Principais métodos de recuperação e purificação da β -galactosidase	53
2.3.4 Purificação de baixa resolução	53
2.3.5 Purificação de alta resolução	54

2.4 CONCLUSÃO	66
2.5 REFERÊNCIAS	67
CAPÍTULO 3 – Secagem de células de <i>Kluyveromyces marxianus</i> com expressão da atividade de β -galactosidase por <i>spray drying</i>	76
3.1 INTRODUÇÃO	78
3.2 MATERIAL E MÉTODOS	81
3.2.1 Microrganismo, substratos e reagentes	81
3.2.4 Determinação da atividade enzimática e análises físico-químicas	84
3.2.4.2 Umidade	85
3.2.4.3 Rendimento do processo de secagem	86
3.2.4.4 Atividade de água	86
3.2.4.5 Higroscopicidade	86
3.2.5 Estabilidade ao armazenamento das células de <i>K. marxianus</i> que expressam atividade de β -galactosidase seca por <i>spray drying</i>	87
3.2.7 Avaliação morfológica das células de <i>K. marxianus</i> seca por <i>spray dryer</i>	90
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	91
3.3.1 Resultados da atividade enzimática e análises físico-químicas da secagem das células no <i>spray dryer</i> em diferentes temperaturas	91
3.3.3 Estudo da estabilidade térmica da célula de <i>K. marxianus</i> que expressa atividade de β -galactosidase seca por <i>spray drying</i>	103
3.3.4 Avaliação morfológica das células de <i>K. marxianus</i> seca por <i>spray drying</i>	111
4. CONCLUSÃO	114
3 REFERÊNCIAS	116
ANEXO A	125
ANEXO B	126
APÊNDICE A	127

APÊNDICE B.....	128
APÊNDICE C.....	129

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1: Reação da hidrólise da Lactose	13
Figura 1.2: fluxograma da fonte da β -galactosidase.....	17
Figura 1.3: composição do permeado do soro de leite	21
Figura 1.4: Imagem do processo de atomização no spray dryer.....	23
Figura 2.1: Representação de localização intracelular da expressão de β -galactosidases em Microrganismos	44
Figura 3.1: Fluxograma do desenvolvimento da metodologia experimental utilizada para produzir e secar as células de <i>Kluyveromyces marxianus</i> por <i>spray drying</i>	76
Figura 3.2: Determinação da atividade enzimática	80
Figura 3.3- Estabilidade ao armazenamento.....	83
Figura 3.4-Estudo da estabilidade ao armazenamento da célula de <i>K. marxianus</i> que expressa atividade de β -galactosidase: A) produto armazenado à 4°C e B) à 25°C.....	94
Figura 3. 5-Resultados da estabilidade térmica das células de <i>K. marxianus</i> que expressam atividade de β -galactosidase seca com maltodextrina e maltodextrina com tripolifosfato de sódio por <i>spray drying</i> ao longo do tempo de incubação.....	99
Figura 3.6 - Ajuste do modelo de Arrhenius (___) aos dados experimentais (valores de kd) para micropartículas de células com maltodextrina.....	104
Figura 3.7 - Ajuste ao modelo de Arrhenius (___) aos dados experimentais (valores de kd) para micropartículas de células com maltodextrina e TPP.....	105
Figura 3.8 – a) Microscopias eletrônicas de varredura: a) célula sem agente carreador; b) célula com adição de maltodextrina; c) célula com adição de maltodextrina e tripolifosfato de sódio e d) célula e tripolifosfato de sódio, com aumento (amplificação) de 10.000 vezes.....	106

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1: Utilização do permeado do soro para produção de bioprodutos de valor agregado.....	18
Tabela 2.1: Propriedades da β -galactosidase produzidas por diferentes microrganismos e as características e condições ambientais	52
Tabela 2.2: Recuperação e purificação da enzima β -galactosidase através de diversos métodos.....	57
Tabela 3.1: Atividade enzimática da suspensão celular e após a secagem.....	91
Tabela 3.2: Parâmetros físicos- químicos das amostras secas e rendimento de secagem.	94
Tabela 3.3- Ajuste dos dados experimentais ao modelo de desativação térmica de primeira ordem para β -galactosidase presente na célula de <i>K. marxianus</i> seca por <i>spray drying</i> com adição de maltodextrina e maltodextrina e tripolifosfato de sódio.....	101
Tabela 3.4 - Equações de desativação térmica de primeira ordem.....	102
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 <i>K. marxianus</i> seca por <i>spray drying</i>	102

LISTA DE SÍMBOLOS

V_{max}	Velocidade máxima de reação em uma determinada concentração de enzima
β	Beta - forma anomérica da enzima β -galactosidase
GRAS	Geralmente Reconhecidos como seguros
GOS	Galacto-oligossacarídeos
T	Temperatura absoluta (K)
A	Atividade enzimática
A_0	Atividade enzimática inicial
A/A_0	Atividade enzimática em relação à inicial
α_1	E1/E Razão entre a atividade específica do estado final (E1) para uma modelagem de inativação com uma única etapa e a atividade inicial (E)
k_d	Constante cinética de desativação térmica
$t_{1/2}$	Tempo de meia-vida
A^*	Fator de frequência para a reação
E_a	Energia de ativação do processo de desativação térmica da enzima
R^2	Coeficiente de correlação
t	t de Student
TPP	Triplifosfato de sódio
p	Nível de significância
$\sum(V - \bar{V})^2$	Somatória dos quadrados dos desvios das observações (V) em relação ao modelo ($\bar{V}$)
U	Atividade enzimática (μmol de glicose por minuto)

INTRODUÇÃO

Diariamente bilhões de pessoas em todo o mundo fazem o consumo do leite e seus derivados, reconhecido como um alimento completo que fornece macro e micronutrientes que são essenciais para o desenvolvimento e crescimento do corpo humano. A proteína presente no leite é considerada de alto valor biológico, apresentando todos os aminoácidos essenciais. Estudos científicos revelam que o consumo de leite e derivados pode apresentar um papel protetor contra doenças, inclusive as doenças crônicas mais prevalentes como hipertensão arterial, obesidade, diabetes melitos e câncer, e poucos efeitos adversos à saúde foram descritos como alergia a proteína do leite e intolerância à lactose (ANTUNES et al., 2023).

Entretanto, uma grande parte da população mundial é atingida pela má absorção de lactose, o carboidrato presente no leite, que dificulta a utilização dos nutrientes do leite. Porém, somente quando isso resulta em sintomas gastrointestinais, como náusea, diarreia, dores abdominais e inchaço, que é definido como intolerância à lactose. A intolerância à lactose também leva a outros problemas nutricionais como a deficiência de minerais, incluindo cálcio e zinco a longo prazo, o que implica em dificuldades no crescimento e desenvolvimento de crianças e adolescentes (LI et al., 2023).

Estima-se que aproximadamente 70% da população mundial é afetada por algum nível de intolerância à lactose (ANTUNES et al., 2023). Com isso, muitos indivíduos optam por evitar os produtos lácteos. Há diversas estratégias para minimizar os sintomas causados pela ingestão de lactose, como consumir produtos com baixo teor de lactose ou sem lactose, ou uso da enzima β -galactosidase (PEARLMAN; AKPOTAIRE, 2019).

Nesse contexto, o mercado atual de produtos lácteos sem lactose é um dos segmentos de indústria de laticínios com grande crescimento, com desenvolvimento de novos produtos isentos de lactose para o consumo, devido ao grande número de indivíduos intolerantes e a outros fatores como aumento do poder de compra e aumento dos níveis de educação. A América Latina e a Europa Ocidental são os mais crescentes e maiores mercados de produto sem lactose (ZUBA-CISZEWSKA et al., 2022).

A enzima β -galactosidase (β -D-galactosídeo-galacto-hidrolase, EC 3.2.1.23) é responsável por catalisar a hidrólise da ligação glicosídica da lactose, liberando os monossacarídeos glicose e galactose. Essa aplicação é importante na indústria alimentícia, para produzir alimentos com baixo teor de lactose ou sem lactose, isso faz com que melhore a digestibilidade, solubilidade, doçura e sabor dos produtos lácteos. Independentemente da

crescente demanda por β -galactosidases, as características operacionais para seu uso e os custos de produção são fatores limitantes do uso dessa enzima em processos industriais (GENNARI et al., 2023).

As β -galactosidases podem ter origem vegetal, animal ou microbiana (levedura, bactéria e fungo), mas são as enzimas microbianas que apresentam maior produtividade, com redução de custos e devem provir de microrganismos “Geralmente Reconhecidos como Seguros” (GRAS). As enzimas obtidas de leveduras (como as de *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces fragilis* e *Kluyveromyces marxianus*) e de fungos (*Aspergillus oryzae* e *Aspergillus niger*) apresentam grande potencial industrial e comercial (DUTRA ROSOLEN et al., 2015).

A depender do microrganismo produtor, as enzimas podem estar localizadas extracelulares ou intracelulares. No primeiro caso, o caldo fermentado geralmente é submetido a etapas de recuperação e possivelmente de purificação dessas enzimas. Por outro lado, as enzimas localizadas no interior das células precisam ser extraídas, necessitando da utilização de métodos específicos de rompimento celular. Esses métodos podem ser químicos, com o uso de detergentes ou solventes orgânicos; físicos, como ultrassonicação, homogeneização a alta pressão ou choque osmótico; ou enzimáticos, utilizando lisozima para romper a parede celular (BALASUNDARAM; PANDIT, 2001; OLIVEIRA DE MEDEIROS; VEIGA BURKERT; JULIANO KALIL, 2012 LEMES et al., 2014;).

O microrganismo *Kluyveromyces marxianus* é conhecido pelas suas vantagens industriais, na produção de β -galactosidase, como sua capacidade de assimilar lactose como fonte de carbono. Por outro lado, esse microrganismo produz a β -galactosidase de forma intracelular sendo necessário o uso de métodos para a recuperação dessa enzima. A escolha do método de recuperação e purificação é de extrema importância, pois impacta de forma significativa na atividade da enzima e alguns métodos podem não ser compatíveis com o uso na indústria alimentícia (DE SOUSA et al., 2021; RIBEIRO et al., 2024).

A secagem por atomização (*spray drying*) é um método que pode ser utilizado para recuperação da enzima, tanto por meio da secagem das células que contêm a enzima, quanto para secar as próprias enzimas. A secagem por *spray drying* é caracterizada pela atomização de uma solução, a qual forma inúmeras gotículas que ao entrarem em contato com uma corrente de ar aquecida, secam quase instantaneamente produzindo um pó e sendo esse separado do ar de secagem por meio de um ciclone, que compõe o equipamento (PIÑÓN-BALDERRAMA et al., 2020). O produto, por apresentar baixa umidade e atividade de água, geralmente é estável durante o armazenamento em condições adequadas de temperatura e umidade relativa. Em processos de secagem, como em *spray dryer*, pode ser utilizado um material de parede que irá

proteger o núcleo (que pode ser um composto bioativo, um microrganismo, uma enzima ou outro material de interesse). Muitos são os materiais que comumente são utilizados como agentes carreadores para o *spray drying*, como a maltodextrina, goma Arábica, quitosana, dentre outros (SAMANTHA et al., 2015).

A fim de aprimorar propriedades como estabilidade térmica de materiais secos por atomização, solubilidade e resistência mecânica, podem ser utilizados agentes reticulantes. Nesse contexto, o uso de tripolifosfato de sódio (TPP) é uma alternativa segura e eficaz aos reticuladores químicos tóxicos, como o glutaraldeído, sendo amplamente utilizado na reticulação iônica de bioprodutos. Essa abordagem evita o uso de reagentes nocivos, oferece maior biocompatibilidade, simplicidade no processo e permite a formação de micropartículas com boa estabilidade (SRIVASTAVA et al., 2016; WU et al., 2020).

Objetivos

Com base no exposto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar as condições operacionais de secagem por *spray drying* do caldo fermentado, proveniente da fermentação da levedura *Kluyveromyces marxianus*, que expressa atividade de β -galactosidase intracelular, visando à recuperação da enzima e à preservação de sua atividade enzimática.

Objetivos específicos:

- Produzir a β -galactosidase por *Kluyveromyces marxianus*, em condições de fermentação otimizadas, conforme trabalhos anteriores (DE SOUSA et al., 2021; RIBEIRO et al., 2024), para obter o caldo fermentado com expressão de β -galactosidase.
- Avaliar diferentes temperaturas de secagem com e sem o uso de maltodextrina, como agente carreador, e analisar atividade enzimática bem como a caracterização do pó quanto a umidade, atividade de água, solubilidade e higroscopicidade;
- Estudar a estabilidade da enzima, com agente carreador (maltodextrina) e agente reticulante (tripolifosfato de sódio) ao longo do tempo sob diferentes condições de armazenamento, incluindo temperatura ambiente e sob refrigeração;
- Estudar a estabilidade térmica da célula de *K. marxianus* com agente carreador (maltodextrina) e agente reticulante (tripolifosfato de sódio) que expressa atividade de β -galactosidase;
- Avaliar a microestrutura (MEV) da célula de *K. marxianus* seca por *spray drying*.

Estrutura do trabalho

Este trabalho está estruturado de maneira que os conteúdos abordados tenham uma sequência lógica. Desta maneira os capítulos foram divididos da seguinte forma:

Capítulo 1 – Revisão Bibliográfica;

Capítulo 2 – Recuperação e purificação de β -galactosidase de diferentes fontes microbianas;

Capítulo 3 – Secagem de células de *Kluyveromyces marxianus* com expressão da atividade de β -galactosidase por *spray drying*.

CAPÍTULO 1 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Produtos lácteos

O leite é rico em nutrientes, uma das fontes nutricionais mais adequadas para o ser humano, desempenha um papel de suma importância na manutenção de uma dieta equilibrada (LI et al., 2023a). O leite bovino pode ser consumido após o tratamento térmico ou transformado em diversos produtos lácteos. Suas propriedades nutricionais e tecnológicas são importantes para as formulações de produtos de alta qualidade. O leite bovino é composto, respectivamente, de água (87%), lactose (4–5%), lipídios e gordura (3–4%), proteína (soro e caseína) (3%), minerais (0,8%) e vitaminas (0,1 %) (ZHAO et al., 2023). Ademais, os produtos lácteos contêm ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs), ômega-3 (ω -3) e peptídeos bioativos (WITTEWER; LEE; RANADHEERA, 2023).

Os produtos lácteos possuem diversos efeitos positivos na saúde, como benefícios na manutenção dos ossos e dentes, prevenção da hipertensão arterial, doenças cardiovasculares, contribuição na hidratação corporal e reparação da musculatura após o exercício físico, também é notório os benefícios na prevenção/recuperação da diabetes tipo 2. Além disso, produtos lácteos com baixo teor de gordura podem ajudar na redução do peso corporal e prevenir a obesidade (RABIEI et al., 2021).

Diante da importância do leite na nutrição, quando a intolerância à lactose não é tratada de forma adequada, resulta em alterações bioquímicas e mudanças na alimentação do indivíduo. Ao evitar leite e derivados pode levar à deficiência de nutrientes e favorecer o desenvolvimento de doenças como osteoporose e diminuição da qualidade de vida (OLIVEIRA et al., 2022).

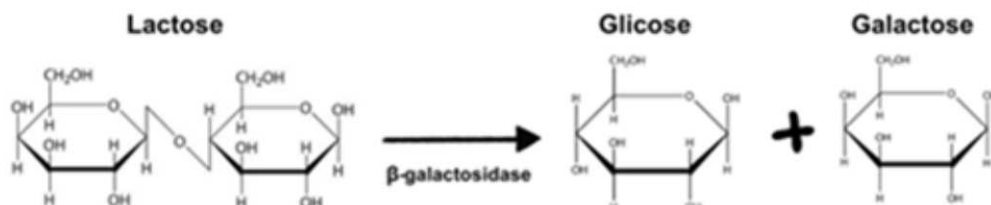
1.2 Intolerância à lactose

1.2.1 Fisiopatologia

A lactose é o principal carboidrato do leite (SZILAGYI; ISHAYEK, 2018) e como já exposto, cerca de 70% da população mundial é afetada pela intolerância à lactose, que causa problemas gastrointestinais que ocorrem devido à ausência ou insuficiência da enzima β -galactosidase (β -gal) (ou ainda lactase), que é responsável pela hidrólise da lactose em glicose e galactose (JAYAPRAKASH et al., 2023). A redução da expressão do gene da lactase no corpo humano resulta então na intolerância à lactose. Tal circunstância reduz a quantidade de lactase presente no intestino delgado, isso significa que indivíduos com níveis baixos ou ausência de

lactase não conseguem hidrolisar a lactose no intestino delgado (ANTUNES et al., 2023). Na Figura 1.1 está representado a reação da hidrólise da lactose.

Figura 1.1- Esquema da reação da hidrólise da lactose.



Fonte: Elaborado pelos autores, 2025.

O gene que codifica a enzima lactase, LCT, possui uma variante de íntron rs4988235 no gene vizinho MCM6 que está associada à ativação transcricional de LCT e influência na intolerância à lactase. Com isso, os portadores homozigotos de citosina (CC) tornam-se intolerantes à lactase, enquanto os portadores heterozigotos e homozigotos de timina-timina (TT) e timina-citosina (TC) conseguem digerir a lactose na fase adulta, pois ela ainda é produzida (JENSEN; TIMOFEEVA; BERG-BECKHOFF, 2023).

A digestão e absorção da lactose dependem da enzima lactase florizina hidrolase (LPH), presente na borda em escova no intestino proximal. Dois sítios enzimáticos intraluminais se projetam no lúmen do intestino, que dividem o dissacarídeo em galactose e glicose, e então são transportados pelos seus respectivos transportadores através da borda em escova intestinal (SZILAGYI; ISHAYEK, 2018).

A lactase tem sua atividade diminuída devido a ocorrência de doenças como celíaca e inflamação intestinal e/ou com a idade, resultando em alta concentração de lactose não digerida remanescente no intestino delgado, diante disso tem-se o aumento da carga osmótica local e o afluxo de água no intestino. Enquanto isso, a lactose é metabolizada pela microbiota no intestino e produz ácidos graxos de cadeia curta (acetato, butirato, lactato, propionato e formato) e gases (metano, hidrogênio, e dióxido de carbono) (LI et al., 2023a).

1.2.2 Manejo nutricional

Adequações dietéticas podem diminuir ou aliviar os sintomas clínicos da intolerância à lactose. A tendência atual é o desenvolvimento de alimentos de forma nutracêutica e funcional, para o intolerante à lactose, como produto lácteo fermentado, produto com baixo teor de lactose, preparação de lactase, bebida à base de plantas, probióticos e prebióticos. A presença desses

produtos pode não apenas aliviar os sintomas intestinais provindo da intolerância à lactose, como também melhorar as implicações prolongadas para a saúde causadas por ela e tornar a escolha alimentar mais flexível (LI et al., 2023b) .

Em relação ao conteúdo nutricional, os produtos lácteos hidrolisados podem apresentar um teor de lactose muito baixo ($<0,1$ g/L), porém o teor de glicose e galactose do leite sem lactose é de aproximadamente 25 g/L. A glicose e a galactose promovem mais doçura do que a lactose, permitindo uma redução do açúcar adicionado em laticínios em até 10–15 g/kg, isso faz com que a adição de calorias no produto seja menor. Em relação aos demais aspectos nutricionais, os produtos lácteos sem lactose provavelmente não possuem efeitos nutricionais diferentes no corpo humano em comparação com os laticínios convencionais (DEKKER; KOENDERS; BRUINS, 2019).

1.2.3 Produtos sem lactose no mercado atual

No mercado existem produtos lácteos sem lactose e lactose reduzida e são rotulados como produtos “sem lactose” e com “baixo teor de lactose”. A regulação para o uso desses termos em alimentos varia de acordo com cada país, porém os mais comuns são 10 mg/100 g e 1 g/100 g para “sem lactose” e “baixo teor de lactose”, respectivamente de acordo com a European Food Safety Authority. Já a Food and Drug Administration (FDA) dos EUA não especifica nenhum valor limite para a lactose em alimentos sem lactose e com baixo teor de lactose (YANG et al., 2021). No Brasil para que um produto alimentício seja considerado sem lactose, a concentração de lactose deve ser inferior a 100 mg para cada 100 g do produto, e os produtos considerados com baixo teor de lactose devem ter sua concentração entre 100 mg e 1g por 100 g, conforme a resolução da legislação brasileira (BRASIL, 2017).

Alguns produtos lácteos que possuem pouca lactose geralmente são bem tolerados por intolerantes à lactose, como o queijo Gouda, onde o processo de produção inclui uma etapa de lavagem da coalhada para diminuir o teor de lactose. Porém, para a maioria dos queijos, o teor de lactose só diminui devido à ação das bactérias no processo de maturação. Sendo assim, queijos frescos possuem lactose suficiente para causar uma reação em pessoas intolerantes à lactose (DEKKER; KOENDERS; BRUINS, 2019).

O teor de lactose na manteiga é inferior a 0,1%, pois durante a sua produção, a maioria dos componentes solúveis em água do leite, incluindo a lactose, são removidos. Entretanto, muitos outros produtos alimentícios que contém o leite como ingrediente, como alguns chocolates e diversos produtos de panificação não são isentos de lactose (DEKKER; KOENDERS; BRUINS, 2019).

A linha de produtos sem lactose tem ganhado muito espaço e interesse na indústria de laticínios. A taxa de crescimento anual global de 2017 a 2022 foi de cerca de 7% e representou 80% do total de produtos sem lactose. Nos Estados Unidos, o leite sem lactose representou 4,0% de vendas anual do total de leite líquido e as vendas aumentaram 12% em 2017. Nos anos recentes, os produtos lácteos sem lactose continuaram a se diversificar, nos quais leite e iogurte foram os produtos de maior destaque, enquanto queijo, manteiga e leite aromatizado sem lactose também ganharam maior representatividade (LI ET AL., 2023a).

No Brasil também houve crescimento no mercado de produtos sem lactose (DAVID; GUIVANT, 2020). Na Cooperativa Frimesa, com sede em Medianeira - PR, relata que em 2021 quase 10% do volume de suas vendas de leite é na versão zero lactose. A empresa se adaptou com a demanda de clientes com restrição alimentar, com isso iogurtes, creme de leite, leite condensado sem lactose se somaram no mercado e em 2021, cinco novos itens foram lançados, com destaque para iogurtes e a opção de *petit suisse* (CONFEDERAÇÃO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA NO BRASIL, 2021).

1.3 Produção enzimática

A biocatálise tem substituído rapidamente a catálise química devido à sua cinética eficiente, às alternativas ecológicas e aos benefícios econômicos. Nas últimas décadas, houve um crescimento notável nas aplicações comerciais de enzimas em diversos setores, como alimentos, biocombustíveis, cosméticos, farmacêutico, agro, têxtil, couro, gestão de resíduos e assim por diante, sendo o uso da β -galactosidase uma das aplicações para a hidrólise da lactose, como visto anteriormente (FASIM; MORE; MORE, 2021; NEWTON et al., 2018).

As enzimas microbianas ganham destaque pela produção via fermentativa que é um método amplamente utilizado na indústria biotecnológica para a produção de enzimas em grande escala. A produção das enzimas pode ser por fungos e leveduras ao qual transformam substratos orgânicos em diferentes produtos através de vias anaeróbicas ou aeróbicas. Durante a fermentação, os microrganismos são cultivados em biorreatores com condições controladas de temperatura, pH e nutrientes, promovendo seu crescimento e a síntese das enzimas desejadas. As principais vantagens desse processo incluem a utilização de substratos econômicos e renováveis, além da produção de enzimas altamente específicas e com grande atividade catalítica.

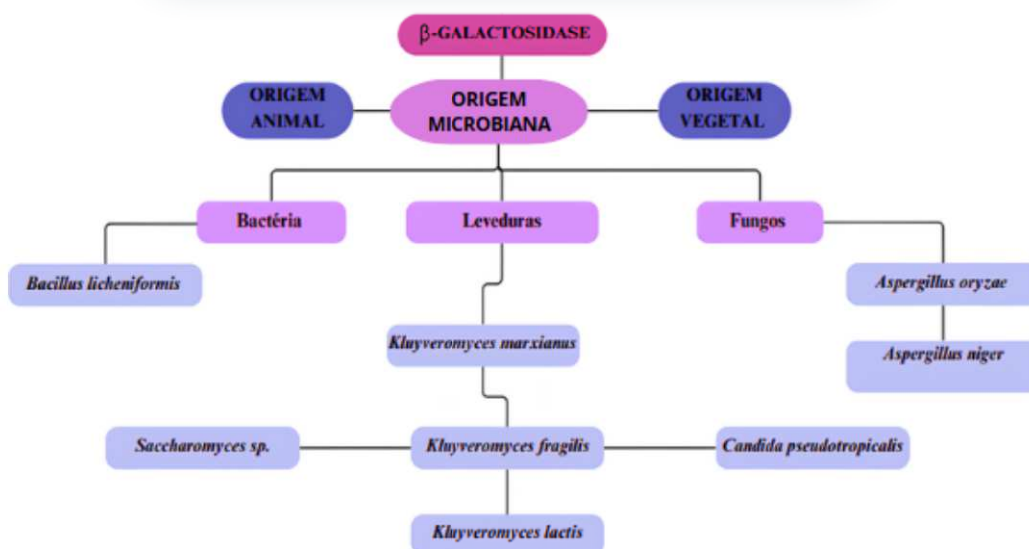
Técnicas como Fermentação Submersa (SMF) e Fermentação em Estado Sólido (SSF) são utilizadas para a produção em larga escala de compostos bioativos, como as enzimas (FASIM; MORE; MORE, 2021). A SMF, técnica geralmente mais utilizada, envolve o cultivo

controlado de microrganismos em meios de substratos líquidos, como caldo, com alta disponibilidade de oxigênio, temperatura, pH e níveis de dióxido de carbono ideais, enquanto o SSF utiliza substratos sólidos, como resíduos agroindustriais com reduzido teor de umidade (FASIM; MORE; MORE, 2021; MEGHWANSHI et al., 2020).

A enzima β -galactosidase atua no resíduo terminal da lactose galactopiranosil (Galb1-4Glc) produzindo glicose e galactose. A β -galactosidase é vastamente encontrada na natureza, em plantas, principalmente amêndoas, pêssegos e certas espécies de rosas selvagens; estudos avaliaram a presença em órgãos de animais como cérebro, intestino, testículos, placenta e tecidos cutâneos. A enzima, também, é encontrada em microrganismos como leveduras, *Kluyveromyces lactis*, *Candida pseudotropicalis*, *Kluyveromyces fragilis* e muitas bactérias, como *Lactobacillus bulgaricus*, *Escherichia coli*, *Bacillus sp* e *Streptococcus lactis*. Pode ser produzida também pela enorme população de fungos, como *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus niger* e *Aspergillus phoenecia* (BANO et al., 2021).

A β -galactosidase extraída de fontes microbianas é uma das enzimas mais relevantes na indústria alimentícia (NGUYEN et al., 2019). Dentre os microrganismos permitidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) se encontram os fungos *Aspergillus niger* e *Aspergillus oryzae* as leveduras *Candida pseudotropicalis*, *Kluyveromyces fragilis*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus* e *Saccharomyces sp* e a bactéria *Bacillus licheniformis* (BRASIL, 2014). Na Figura 1.2 é apresentado o fluxograma de fontes de β -galactosidase e alguns exemplos de microrganismos produtores.

Figura 1.2- Fluxograma das principais fontes de β -galactosidase.



Fonte: Elaborado pelos autores, 2025.

A escolha da fonte de produção da β -galactosidase normalmente depende das condições da reação de hidrólise e do objetivo do uso, alimentício, farmacêutico ou ambiental. A enzima obtida a partir de leveduras apresentam geralmente pH ótimo entre 6,0 e 7,0 e o seu uso é mais adequado para a hidrólise da lactose do leite. Por outro lado, as enzimas produzidas por fungos possuem pH ótimo entre 2,5 e 5,4 e são mais aplicadas para a hidrólise ácida de soro de leite. É necessário também avaliar as demais características como a elevada atividade enzimática a baixa temperatura e termoestabilidade (DUTRA ROSOLEN et al., 2015).

A β -galactosidase é uma das principais enzimas na indústria de alimentos. A lactose é um açúcar higroscópico com forte tendência a absorver odores e sabores, isso pode acarretar muitos defeitos como textura arenosa e granulada, deposição arenosa ou cristalização, entre outros, em sobremesas concentradas congeladas e outros produtos lácteos refrigerados. Porém, a sua hidrólise com β -galactosidase ajuda a superar estes problemas. Além disso, a hidrólise da lactose é utilizada para realçar sabores, melhorar a solubilidade, a doçura e a digestibilidade de produtos lácteos. Além disso, pode-se obter prebiótico como os galacto-oligossacarídeos (GOS), que são obtidos por meio do processo de transgalactosilação, no qual a galactose, liberada da lactose através da ação da β -galactosidase, é transferida para outras moléculas de açúcar, resultando na formação de oligossacarídeos (SINGH; SAMBYAL, 2023).

Os GOS são compostos prebióticos obtidos principalmente a partir da lactose, por meio da ação enzimática da β -galactosidase, a qual catalisa reações de transgalactosilação sob condições controladas, são componentes alimentares benéficos para o funcionamento saudável do fígado e do intestino pois estimulam o crescimento da microflora intestinal (KAUR; PANWAR; PANESAR, 2020; SINGH; SAMBYAL, 2023). Na indústria alimentar, os GOS apresentam vantagens significativas, como maior tolerância a altas temperaturas e condições de pH mais baixas. Essa resistência permite sua incorporação em diversas matrizes alimentares. Os GOS são utilizados para melhorar a qualidade sensorial e a doçura de diversos produtos alimentares. Em bebidas e laticínios, foi relatado que os GOS aprimoram o sabor, a firmeza, a espalhabilidade, controlam o risco de cristalização e melhoram a cremosidade dos produtos. Essas propriedades fazem dos GOS um ingrediente valioso para a indústria de alimentos, contribuindo para produtos mais saudáveis e com melhores características sensoriais (DESHMUKH et al., 2025).

BOSSO et al. (2020), realizaram um estudo com a produção de β -galactosidase a partir da levedura *Saccharomyces fragilis*, e utilizaram o soro de queijo para o crescimento da levedura. De acordo com os autores, foi obtido maior atividade da β -galactosidase (58,51

U/mL) nas condições de 35°C, pH 6,0 e concentração de inóculo de 20%, e em baixas temperaturas, pH e concentração do inóculo a sua produção foi menor (0,10 U/mL).

MARIM et al. (2021) produziram a enzima em meio contendo soro de queijo suplementado com 3g/L de extrato de levedura, utilizando a levedura *Kluyveromyces marxianus*. Os inóculos foram preparados em meio YEP-lactose e incubados em agitação, por 15h, a 30°C. A enzima foi extraída utilizando esferas de vidro e um misturador vórtex. A imobilização da enzima foi realizada em esferas de alginato de cálcio e apresentaram maior atividade que a enzima livre, na temperatura de 45°C a atividade da enzima imobilizada foi de 84,1% e da enzima livre foi 67,5%.

Os microrganismos da cepa de *Kluyveromyces* (especialmente a *K. lactis* e *K. marxianus*) apresentam na literatura bons resultados de produção de enzimas devido à sua capacidade de atuar em substratos amplamente variáveis (como o soro de queijo e outros resíduos lácteos devido às suas características fisiológicas únicas e capacidade de produzir proteínas heterólogas como hospedeiro diligente). Além disso, são microrganismos que conseguem atuar em ampla faixa de temperatura, realizam fermentação aeróbica e apresentam tolerância ao pH. A *K. lactis* é a espécie de levedura mais conhecida do gênero das *Kluyveromyces*, e sua alta atividade de β -galactosidase e segurança da sua utilização a tornam apropriada para a produção de produtos lácteos sem lactose. Possui uma ampla perspectiva de aplicação na indústria alimentícia pela sua eficiente secreção de proteínas, características de fermentação em larga escala e integração genômica. A *K. marxianus* é também uma levedura de qualidade alimentar e termotolerante, possui uma ampla faixa de temperatura de crescimento com um limite superior de 52°C, possui rápida taxa de crescimento, capacidade de usar uma variedade de substratos baratos e a condições mais ácidas (KARIM et al., 2020; QIU et al., 2023). Além disso, a *K. marxianus* obteve o status de Presunção Qualificada de Segurança (QPS) e Geralmente Considerado como Seguro (GRAS) na União Europeia e nos Estados Unidos, respectivamente, o que a torna particularmente adequada para a produção de produtos farmacêuticos e enzimas e proteínas de qualidade alimentar (KARIM, AIDER 2022).

Estudos demonstram o grande potencial da β -galactosidase de *Kluyveromyces* para a hidrólise da lactose em indústrias de laticínios, com rendimentos relatados acima de 99,5%. A enzima é constituída por oligômeros formados por monômeros individuais e possuem peso molecular de 119 kDa que podem formar estruturas diméricas ou tetraméricas ativas (DE ALBUQUERQUE et al., 2021). Além da β -galactosidase, a capacidade de *K. marxianus* de produzir uma variedade de enzimas a torna uma levedura valiosa para diversas aplicações

industriais. Ela é também utilizada na produção de enzimas como as pectinases, lipases, inulinasas e proteases (BILAL et al., 2022).

Assim, a levedura *Kluyveromyces marxianus* tem sido utilizada na produção de β -galactosidase por apresentar rápido crescimento, grande potencial de aplicação na biotecnologia, é geralmente reconhecida como segura (GRAS), e utiliza como fonte de carbono a lactose. Atualmente, existe um interesse particular na lactose como fonte de carbono para aumentar o uso de soro de leite e permeado de soro de leite, subprodutos da indústria de laticínio, que possuem altas concentrações de lactose (DE SOUSA et al., 2021).

1.4 Permeado do soro de leite e Soro de leite como substrato para a fermentação da produção de enzimas

A produção de queijo é um processo de alto rendimento e produz grandes quantidades de soro de leite como subproduto, normalmente, na produção de 1 kg de queijo aproximadamente 9 kg de soro é gerado. O soro (Whey) e o permeado de soro (WP) são os principais subprodutos agroindustriais da produção de queijo. O Whey é o resíduo líquido remanescente após o leite ter sido coalhado e coado e WP é o coproduto obtido após a recuperação de proteínas de soro de leite líquido por uma combinação de ultrafiltração com diafiltração que tem por objetivo remover lactose e minerais (KARIM; AIDER, 2022; WILSON et al., 2022).

O soro do leite é classificado em duas categorias de acordo com a forma de remoção da caseína. Quando a remoção da caseína for realizada por adição de ácido (pH 4,6) o soro é denominado então como soro ácido, sendo subproduto da produção de queijo cottage. Porém, se a caseína for removida por ação da enzima renina forma-se o soro doce produzido através da elaboração do queijo mussarela, cheddar, suíço, prato, coalho, dentre outros (PANESAR et al., 2007; SZUDERA-KONCZAL et al., 2020).

Os principais constituintes do permeado do soro de leite são lactose, minerais, baixa quantidade de proteínas do soro, como β -lactoglobulina e α -lactalbumina, assim como outras moléculas pequenas, como aminoácidos livres e peptídeos. Quando o soro de queijo cru e/ou WP é descartado de forma indevida, se cria enormes problemas ambientais porque eles têm alta demanda química de oxigênio (DQO) e demanda biológica (bioquímica) de oxigênio (DBO) com um valor de 60.000–80.000 e 30.000–50.000 mg/L O₂, respectivamente, isso devido principalmente ao seu alto teor de lactose. Devido a esse fator, o aproveitamento desse resíduo da indústria queijeira é de extrema importância (KARIM; AIDER, 2020; YADAV et al., 2015).

A partir dessa valorização do soro de leite e seus derivados nas últimas décadas, o foco

tem sido na fração proteica do soro de leite na produção de bebidas proteicas. No entanto, a crescente produção de produtos proteicos de soro de leite em todo o mundo resulta também no aumento da produção de subprodutos destes processos, como o permeado de soro de leite (WP). Atualmente, as principais aplicações destes resíduos são a produção de lactose comestível ou de qualidade farmacêutica, ou permeados em pó secos por pulverização (O'DONOGHUE; MURPHY, 2023).

Recentemente, a utilização de subprodutos de baixo custo como fontes de carbono e nitrogênio tem ganhado atenção para a produção de metabólitos valiosos. A conversão microbiana de soro de leite/WP e lactose em metabólitos fermentados valiosos, como enzimas, ácidos orgânicos, ácidos graxos, substâncias aromatizantes voláteis e proteínas unicelulares, pode ser uma abordagem sustentável para o manejo e valorização do soro de leite (KARIM; AIDER, 2020).

Além disso, o Codex Alimentarius em 2017 elaborou uma nova norma para promover a utilização de permeado lácteo em pó como ingrediente na indústria de alimentos. Os principais ramos para utilização do permeado em novos produtos alimentícios em 2021 foram os setores de confeitaria (27,4%), panificação (17,8%), lanches (9,3%), laticínios (8%) e bebidas quentes (6,6%) (O'DONOGHUE; MURPHY, 2023). A composição do permeado do soro de leite pode ser observada na Figura 1.3:

Figura 1.3- Composição do permeado do soro de leite em base seca



Fonte: (DE SOUSA et al., 2021; O'DONOGHUE; MURPHY, 2023)

Sendo assim, a utilização do permeado do soro de leite, que é rico em lactose, para a produção de bioprodutos de valor agregado, como as enzimas, através da fermentação, representa uma abordagem sustentável e inovadora, com redução de impacto ambiental gerado

pelo descarte desse produto. Essa prática está alinhada aos princípios da economia circular, ao promover o aproveitamento de resíduos industriais e a valorização de matérias-primas secundárias. Além disso, contribui diretamente para os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) da ONU, como o ODS 9 (Indústria, Inovação e Infraestrutura), ao estimular soluções biotecnológicas sustentáveis; o ODS 12 (Consumo e Produção Responsáveis), ao incentivar o uso eficiente de recursos e a redução de resíduos; e o ODS 13 (Ação Contra a Mudança Global do Clima), ao minimizar os impactos ambientais do descarte de efluentes. Quando aplicada à produção de enzimas como a β -galactosidase, que pode ser utilizada em alimentos sem lactose, essa estratégia também contribui para o ODS 3 (Saúde e Bem-Estar), promovendo a inclusão alimentar para pessoas com intolerância à lactose. Na Tabela 1.1 é apresentado alguns estudos utilizando o permeado do soro na produção de bioprodutos.

Tabela 1.1- Utilização do permeado do soro como substrato para produção de bioprodutos de valor agregado.

Microrganismo	Produto	Referência
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	<i>Pineno</i>	(RISNER et al., 2020)
<i>Candida rugosa</i>	<i>Lipase</i>	(TOMMASO et al., 2011)
<i>Escherichia coli recombinante</i>	<i>Penicilina Acilase</i>	(DE LEÓN-RODRÍGUEZ et al., 2006)
<i>Bacillus</i> sp. TCRDC-MI	α -amilase	(BAJPAI et al., 1991)
<i>Clostridium saccharobutylicum</i> P262	Buranol	(QURESHI; FRIEDL; MADDOX, 2014)
-	Hidrogênio e etanol	(FERREIRA ROSA; SANTOS; SILVA, 2014)
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> 64	Produção de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> 64	(LAVARI ET al., 2015)
<i>Scharomyces cerevisiae</i>	<i>Etanol</i>	(PARASHAR et al., 2016)
<i>Kluyveromyces marxianus</i> ATCC 8554	<i>Etanol</i>	(KOUSHKI; JAFARI; AZIZI, 2012)
<i>Kluyveromyces marxianus</i> CBS 6556	<i>Etanol</i>	(GABARDO et al., 2014)
β -galactosidase de <i>Aspergillus oryzae</i>	<i>Galacto-oligossacarídeos</i>	(MANO; PAULINO; PASTORE, 2019)
β -galactosidase de <i>Kluyveromyces lactis</i>	<i>Galacto-oligossacarídeos</i>	(MANO; PAULINO; PASTORE, 2019)
β -galactosidase de <i>Escherichia coli cepa</i> K12	<i>Galacto-oligossacarídeos</i>	(MANO; PAULINO; PASTORE, 2019)
β -galactosidase de <i>Bifidobacterium bifidum</i>	<i>Galacto-oligossacarídeos</i>	(ORREGO; KLOTZ-CEBERIO, 2022)

A partir dos dados apresentados na Tabela 1.1, pode-se observar que o permeado do soro tem sido vastamente utilizado como substrato para a produção de diversos bioprodutos. Isso demonstra seu potencial como matéria-prima na biotecnologia, possibilitando a geração de

compostos de interesse para diferentes setores, como a alimentícia, química e farmacêutica. Isso não só agrega valor a um subproduto da indústria de laticínios, mas também contribui para a sustentabilidade, ao promover a utilização eficiente de resíduos agroindustriais.

1.5 Reticulação Enzimática e agente carreador

A imobilização de enzimas é uma técnica utilizada a fim de melhorar a estabilidade operacional das enzimas para aplicações industriais (MUKUNDAN et al., 2020). Geralmente, enzimas imobilizadas são biocatalisadores que estão fisicamente ligadas a suportes sólidos específicos e confinadas, com isso podem ser usadas de forma repetida e continuamente, mantendo suas atividades catalíticas (NGUYEN; KIM, 2017). Entretanto, embora não permitindo um uso contínuo da enzima, algumas literaturas também classificam a encapsulação de um biocatalisador como um método de imobilização (WEN et al., 2017; ZABOT et al., 2022).

Os métodos de imobilização de enzimas podem ser classificados como métodos físicos ou químicos (URETA et al., 2020). Dentre esses métodos, por exemplo, os químicos, podem ser realizados por ligações covalentes e reticulação e os físicos por adsorção e encapsulamento (SUVARLI et al., 2022).

A reticulação é um método irreversível de imobilização enzimática, que forma agregados insolúveis de enzimas, e que não requer um suporte. Esse processo é realizado pela formação de reticulações intermoleculares entre as moléculas da enzima por meio de reagentes bi ou multifuncionais (MOHAMAD et al., 2015). Nesse método a enzima imobilizada está presente na mistura reacional e não estão ligadas a suportes. As abordagens na imobilização por reticulação são: uso de agregado de enzima de reticulação (CLEA), cristal de enzima de reticulação (CLEC), enzimas atomizadas reticuladas (CSDE) e enzima solubilizadas reticuladas (CLE). Em alguns casos demandam a utilização de um agente de reticulação, como o glutaraldeído, para reticular moléculas de enzima através das reações dos grupos amino livres de resíduos de lisina no sítio reativo de moléculas de enzima vizinha (NGUYEN; KIM, 2017). No entanto, as enzimas estão mais propícias a perder as suas atividades catalíticas durante o processo de reticulação (LIU et al., 2018).

Nos processos de encapsulamento, a enzima é adicionada na matriz de suporte sem reagir quimicamente com o suporte, pode ser feito por microencapsulação, por aprisionamento de gel/fibra e por inclusão de estruturas metálicas orgânicas (ALMEIDA et al., 2021; NGUYEN, KIM, 2017; LIU et al., 2018).

A microencapsulação é um processo pelo qual os materiais bioativos são revestidos com

outros materiais de proteção, esse método protege os materiais de estresses ambientais, preservação durante o armazenamento e processamento de alimentos (ARSLAN et al., 2015). Na indústria de alimentos essa técnica pode ser utilizada para microencapsular ácidos, óleos, vitaminas, sais, corantes, enzimas, microrganismos, dentre outros (SAMANTHA et al., 2015). A microencapsulação com uso de agentes carreadores pode ser obtida por diversos métodos, como por *spray drying*, *spray chilling*, *spray cooling*, revestimento por extrusão, revestimento em leite fluidizado, aprisionamento lipossômico, liofilização, coacervação, separação por suspensão centrífuga, co-cristalização, complexação por inclusão e gelificação térmica (KAVITAKE et al., 2017). A escolha do agente carreador é importante e devem ser considerados fatores como solubilidade, peso molecular, difusibilidade, objetivo pretendido através da microencapsulação e custos. Os agentes carreadores para a microencapsulação no *spray drying* podem ser carboidratos (amido, maltodextrina, dextranos, sacarose, celulose e derivados), gomas (goma Arábica, ágar, carragena, alginato etc.), proteínas (glúten, caseínas, albuminas, hemoglobina e peptídeos) e lipídios (cera, parafina, diglicerídeos) (COSTA et al., 2015).

No trabalho de Ribeiro et al. (2024), utilizou-se alginato de sódio, maltodextrina DE10, goma Arábica e proteína isolada de soja como agentes careadores para a microencapsulação da β -galactosidase intracelular de *Kluyveromyces marxianus* seca a 90°C por *spray drying*. De acordo com os autores, a maltodextrina e a proteína isolada de soja foram os agentes carreadores mais adequados para microencapsulação da enzima, porque preservaram a atividade enzimática. Além disso, foi reportado no trabalho que a secagem do caldo fermentado sem a presença do agente carreador também preservou a atividade enzimática. Entretanto, na literatura estudada não encontrou-se trabalhos sobre o efeito das condições operacionais do spray dryer na atividade da β -galactosidase produzida por *Kluyveromyces marxianus*.

Para melhorar propriedades como resistência mecânica e estabilidade térmica de materiais secos por atomização, podem ser empregados agentes reticulantes. Esses compostos atuam promovendo a formação de ligações químicas ou iônicas entre macromoléculas, criando uma rede tridimensional estável. Os agentes reticulantes químicos tradicionais, como o formaldeído e glutaraldeído, apresentam preocupações relacionadas à sua toxicidade e ao desconhecimento de seu destino no organismo, podendo exigir etapas adicionais de purificação que aumentam os custos operacionais. O uso de tripolifosfato de sódio (TPP), como agente reticulante, destaca-se nesse contexto por ser um método mais seguro, com condições processuais de menor risco de toxicidade. Além disso, o TPP oferece vantagens como biocompatibilidade, ausência de efeitos tóxicos e facilidade de aplicação em sistemas aquosos,

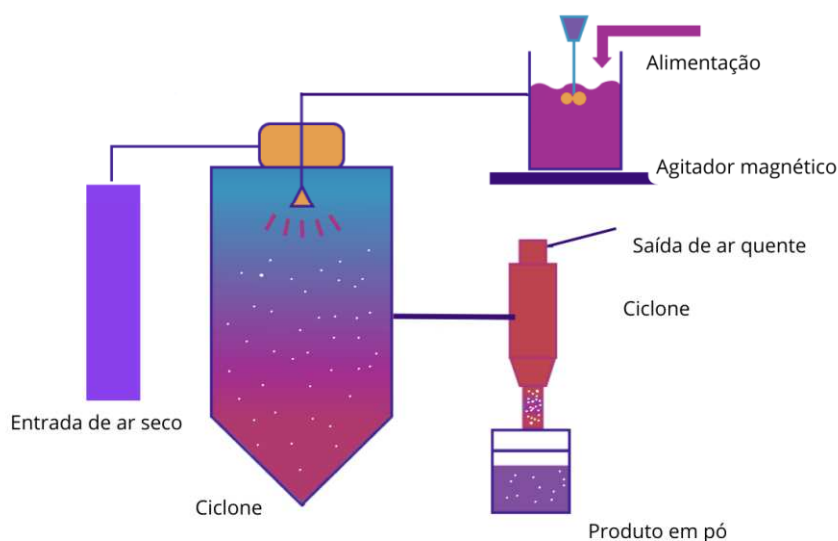
tornando-o uma opção vantajosa para diversas aplicações industriais e científicas (SRIVASTAVA et al., 2016; DÍAZ VERGARA et al., 2023)

1.6 Secagem por *spray drying*

De acordo com Mohtar et al. (2019) os processos de secagem considerados adequados para obter pós enzimáticos estáveis são o *spray drying*, a liofilização e a secagem a vácuo. O processo de secagem por liofilização geralmente é o preferido para secagem de materiais sensíveis ao calor e de alto valor, como proteínas, pois nesse processo a solução ou suspensão é congelada e o solvente é removido por sublimação sob vácuo (MOHTAR et al., 2019). No entanto, a secagem por *spray drying* é considerada uma alternativa muito interessante, especialmente para a secagem de grandes quantidades, pois seu custo é muito inferior ao da liofilização, além de ser um processo mais eficiente, rápido e com facilidade no aumento de escala (SATO et al., 2014; SURESH et al., 2019). A secagem por pulverização é considerada até 6 vezes mais barata por cada kg de água removida, em comparação com a liofilização (LAVARI et al., 2015).

A secagem por atomização (*spray drying*) é um método utilizado para que a solução de alimentação seja transformada em um pó seco através da evaporação do solvente durante a atomização. É um método econômico, contínuo, escalável e rápido para produção de pó seco. Neste processo a solução alimentada evapora rapidamente pois é atomizada por um bico atomizador na forma de gotículas muito finas em uma câmara, as quais entrarão em contato com o ar de secagem, gerando um pó seco particulado com os compostos de interesse, que é recolhido através de um ciclone para um recipiente de coleta (GUPTA et al., 2014). O *spray dryer* também tem sido constantemente utilizado para imobilizar, por meio da microencapsulação, materiais bioativos vulneráveis, como as enzimas (WENG et al., 2022). Na Figura 1.4 está apresentado um esquema de um *spray dryer*.

Figura 1.4- Imagem do processo de atomização no *spray dryer*.



Fonte: Elaborado pelos autores, 2025.

O transporte e armazenamento de enzimas em soluções aquosas são difíceis, uma vez que a água facilita reações de degradação química e/ou física (SURESH et al., 2019). Ao remover a água, reduz o movimento livre das proteínas, reduzindo as mudanças conformacionais, e como resultado, a desnaturação proteica (SAMBORSKA et al., 2005). Além disso, do ponto de vista econômico, a comercialização de enzimas e outros produtos em pó torna-se mais viável, pois a secagem reduz o volume e os custos com transporte e armazenamento. Sendo assim, as soluções enzimáticas são constantemente preservadas na forma de pós secos contendo a enzima para facilitar o seu armazenamento, manuseio, transporte e melhorar a sua conservação (SANTANA et al., 2016). Assim, a secagem por *spray drying* pode ser utilizada para secar o produto do caldo fermentado e melhorar a conservação do produto (tanto se o produto for uma célula como uma enzima).

A otimização dos parâmetros de secagem por *spray drying* como composição e vazão da solução para a secagem, a temperatura e vazão do ar de entrada representam estratégias importantes nesse processo porque podem determinar propriedades físicas das partículas (ZHANG et al., 2019). A densidade, o teor de sólidos e a viscosidade da solução de alimentação, são alguns dos fatores que influenciam nas características do produto seco por *spray drying*. Além disso, as propriedades finais do produto obtido podem ser afetadas por parâmetros operacionais do processo como a vazão e temperatura do ar de secagem, o sentido de movimentação do ar quente e das gotas na câmara de secagem (fluxo co-corrente, contracorrente ou misto), a vazão e pressão do ar do atomizador (SANTANA et al., 2016).

No processo de *spray drying* pode ocorrer inativação enzimática. Com isso a retenção da atividade enzimática que é sensível ao calor, é uma preocupação comum durante esse processo. Algumas alternativas podem ser empregadas para evitar esta situação, como a otimização das condições operacionais do processo de secagem, a adição de agentes adjuvantes ou estabilizadores (SALLEH et al., 2014; GUPTA et al., 2014). Porém, de acordo com Sato et al. (2014), apesar das temperaturas serem altas, o tempo de contato entre as gotas pulverizadas e o ar quente é bem pequeno, com isso há redução da desnaturação térmica. A adição de aditivos também chamados de agente carreador, como polissacarídeos, proteínas e sais, podem ser utilizados como uma barreira física, exercendo função anti-adesiva, protegendo a enzima contra o calor durante o processo. Portanto, é possível realizar a secagem enzimática sem perda considerável de sua atividade (SATO et al., 2014; MOHTAR et al., 2019).

Muitos estudos de secagem por *spray drying* apresentam a obtenção de enzimas com alta estabilidade, garantindo uma longa vida útil as mesmas. As enzimas em pó produzidas por esse método são amplamente utilizadas em setores como a indústria alimentícia, farmacêutica, de detergentes e de biocombustíveis, com papéis essenciais em processos de hidrólises, fabricação de medicamentos, formulação de produtos de limpeza e a conversão de biomassa em combustíveis renováveis. A estabilidade da enzima seca sem microencapsulação depende de fatores como temperatura de armazenamento, umidade relativa e tempo de armazenamento. Apesar de não contar com materiais protetores, enzimas provenientes de microrganismos termotolerantes, como *K. marxianus*, tendem a apresentar maior resistência intrínseca, favorecendo a preservação de sua funcionalidade após a secagem. Com o controle adequado das condições de processamento e armazenamento, é possível obter enzimas ativas e viáveis sem a necessidade de encapsulação ou estabilizantes adicionais (BÜRKI et al., 2011; KARIM; AIDER, 2020; QIU et al., 2023).

Ribeiro et al. (2024) ao secar a 90°C uma β -galactosidase de *K. marxianus* em *spray dryer* sem o uso de materiais protetores, observaram uma atividade enzimática de $245,0 \pm 2,0$ $\mu\text{mol/min}$. Esse resultado evidencia que a enzima manteve boa parte de sua funcionalidade, mesmo submetida em temperatura elevada. Tal desempenho ressalta a robustez da enzima obtida por fermentação da levedura, possivelmente associada às suas propriedades estruturais e à adaptabilidade do microrganismo.

Costa-Silva et al. (2022) avaliaram a secagem de lipase de *Candida rugosa* por *spray drying*, utilizando uma solução de acetato de quitosana + Fe_2O_3 + e glutaraldeído, o qual manteve atividade residual da lipase de 84,6% e 80,3%, respectivamente, após seis meses de estocagem, a 5°C.

Mohtar et al. (2019) também avaliaram a secagem da lipase de *Geobacillus sp* por *spray drying*, obtendo uma atividade de 86,3 U/g quando a enzima foi atomizada a 80°C.

Os resultados do trabalho de JESUS E MACIEL FILHO (2014), ao secarem α -amilase de *Bacillus sp.* em *spray dryer* na temperatura de 145°C, indicaram a preservação de 83% da atividade inicial e uma atividade de água de 0,47.

Busto et al. (2022) estudaram a microencapsulação de protease, comercial e de qualidade alimentar, por *spray dryer* em partículas de quitosana reticuladas, investigando também a influência da concentração de Flavourzyme na atividade da enzima. A atividade máxima de protease nas micropartículas foi obtida com 0,10% (v/v) de Flavourzyme® a 130°C, com atividade enzimática de aproximadamente 12 U.

2 REFERÊNCIAS

ANTUNES, I. C. *et al.* Cow's Milk in Human Nutrition and the Emergence of Plant-Based Milk Alternatives. **Foods**, v. 12, n. 1, p. 99, 1 jan. 2023. <https://doi.org/10.3390/foods12010099>.

ARSALAN, Abdullah *et al.* **Immobilization of β -galactosidase on tannic acid stabilized silver nanoparticles: A safer way towards its industrial application.** *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, v. 226, 5 fev. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2019.117637>.

AZHAR, Mohammad Danial *et al.* Development of carrier material for food applications in spray drying technology: An overview. *In: Elsevier Ltd*, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2021.04.140>.

BAJPAI, Pratima *et al.* Utilization of cheese whey for production of α -amylase enzyme. **Journal of Biotechnology**, v. 18, p. 265–270, 1991. [https://doi.org/10.1016/0168-1656\(91\)90253-R](https://doi.org/10.1016/0168-1656(91)90253-R).

BALASUNDARAM, B.; PANDIT, A. B. Significance of Location of Enzymes on Their Release During Microbial Cell Disruption. **Biotechnology and bioengineering**, v. 75, n. 5, 2001. <https://doi.org/10.1002/bit.10072>.

BANO, Saeeda *et al.* Purification and characterization of β -galactosidase from *Aspergillus fumigatus* PCSIR-2013. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 34, n. 4, p. 1333–1340, 1 jul. 2021.

BARAJAS-ÁLVAREZ, Paloma; GONZÁLEZ-ÁVILA, Marisela; ESPINOSA-ANDREWS, Hugo. Microencapsulation of *Lactobacillus rhamnosus* HN001 by spray drying and its evaluation under gastrointestinal and storage conditions. **LWT**, v. 153, 1 jan. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112485>.

BELLAOUCHI, Reda *et al.* Characterization and optimization of extracellular enzymes production by *Aspergillus niger* strains isolated from date by-products. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 19, n. 1, 1 dez. 2021. <https://doi.org/10.1186/s43141-021-00145-y>.

BILAL, Muhammad *et al.* Bioprospecting *Kluyveromyces marxianus* as a Robust Host for Industrial Biotechnology. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 10, 20 abr. 2022. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.851768>.

BOERIS, Valeria *et al.* Production, recovery and purification of a recombinant β -galactosidase by expanded bed anion exchange adsorption. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 900, p. 32–37, 1 jul. 2012. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2012.05.024>.

BOSSO, Alessandra *et al.* β -galactosidase production by *Saccharomyces fragilis* IZ 275 in cheese whey. **Revista Brasileira de Ciencias Agrarias**, v. 15, n. 1, 2020. <https://doi.org/10.5039/agraria.v15i1a7236>.

BRAGA, Alinne B. A. C. *et al.* braga et al 2019. **Powder Technology**, p. 199–206, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2019.02.037>.

BRANCHU, Sébastien *et al.* Hydroxypropyl- β -cyclodextrin inhibits spray-drying-induced inactivation of β -galactosidase. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 88, n. 9, p. 905–911, 1999. <https://doi.org/10.1021/js9804819>.

BÜRKI, K. *et al.* New insights into respirable protein powder preparation using a nano spray dryer. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 408, n. 1–2, p. 248–256, abr. 2011. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.02.012>

BUSTO, María D. *et al.* Microencapsulation of a Commercial Food-Grade Protease by Spray Drying in Cross-Linked Chitosan Particles. **Foods**, v. 11, n. 14, 1 jul. 2022. <https://doi.org/10.3390/foods11142077>.

CAI, Y. Z.; CORKE, H. Production and Properties of Spray-dried *Amaranthus* Betacyanin Pigments. **1248 JOURNAL OF FOOD SCIENCE**, v. 65, n. 6, 2000. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2000.tb10273.x>.

CAVALCANTI, Rayza Morganna Farias *et al.* Stabilization and application of spray-dried tannase from *Aspergillus fumigatus* CAS21 in the presence of different carriers. **3 Biotech**, v. 10, n. 4, 1 abr. 2020. <https://doi.org/10.1007/s13205-020-2164-z>.

CHEN, W. *et al.* Production, purification, and characterization of a potential thermostable galactosidase for milk lactose hydrolysis from *Bacillus stearothermophilus*. **Journal of Dairy Science**, v. 91, n. 5, p. 1751–1758, 2008. <https://doi.org/10.3168/jds.2007-617>.

CHEN, Yuqiu; LIANG, Xiaodong; KONTOGEORGIS, Georgios M. Optimal Design of Aqueous Two-Phase Systems for Biomolecule Partitioning. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 62, n. 28, p. 11165–11177, 19 jul. 2023. <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.3c00710>.

COSTA-SILVA, T. A. *et al.* Highly effective *Candida rugosa* lipase immobilization on renewable carriers: Integrated drying and immobilization process to improve enzyme performance. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 183, p. 41–55, 1 jul. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2022.04.026>.

DANTAS, Denise *et al.* Influence of spray drying conditions on the properties of avocado powder drink. **Food Chemistry**, v. 266, p. 284–291, 15 nov. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.06.016>.

DE ALBUQUERQUE, Tiago Lima *et al.* β -Galactosidase from *Kluyveromyces lactis*: Characterization, production, immobilization and applications - A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 191, p. 881–898, 30 nov. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.09.133>.

DE ARAÚJO, Nathália Kelly *et al.* Recovery and purification of chitosanase produced by *Bacillus cereus* using expanded bed adsorption and central composite design. **Journal of Separation Science**, v. 39, n. 4, p. 709–716, 1 fev. 2016. <https://doi.org/10.1002/jssc.201500900>.

DE CARVALHO, Catherine T. *et al.* Recovery of β -galactosidase produced by *Kluyveromyces lactis* by ion-exchange chromatography: Influence of pH and ionic strength parameters. **Anais da Academia Brasileira de Ciencias**, v. 94, n. 1, 2022. <https://doi.org/10.1590/0001-3765202220200752>.

DE JESUS, L. F. M. C.; GUIMARÃES, L. H. S. Production of β -galactosidase by *Trichoderma* sp. through solid-state fermentation targeting the recovery of galactooligosaccharides from whey cheese. **Journal of Applied Microbiology**, v. 130, n. 3, p. 865–877, 1 mar. 2021. <https://doi.org/10.1111/jam.14805>.

DE JESUS, S. S.; MACIEL FILHO, R. Drying of α -amylase by spray drying and freeze-drying - A comparative study. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 31, n. 3, p. 625–631, 1 jul. 2014. <https://doi.org/10.1590/0104-6632.20140313s00002642>.

DE LEÓN-RODRÍGUEZ, Antonio *et al.* Production of penicillin acylase by a recombinant *Escherichia coli* using cheese whey as substrate and inducer. **Biomolecular Engineering**, v. 23, n. 6, p. 299–305, dez. 2006. <https://doi.org/10.1016/j.bioeng.2006.09.003>.

DE SOUSA, Carla Cristina *et al.* Synthesis and Immobilization of β -galactosidase from *Kluyveromyces marxianus* Using Ion Exchange Resin. **Industrial Biotechnology**, v. 17, n. 1, p. 27–37, 1 fev. 2021. <https://doi.org/10.1089/ind.2020.0007>.

DEKKER, Peter; KOENDERS, Damiet; BRUINS, Maaike. Lactose-Free Dairy Products: Market Developments, Production, Nutrition and Health Benefits. **Nutrients**, v. 11, n. 3, p. 551, 5 mar. 2019. <https://doi.org/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**, v. 22, n. 4, p. 377–395, jun. 2005. <https://doi.org/10.1080/02652040500100139>.

DESCAMPS, Nicolas *et al.* Glass transition and flowability/caking behaviour of maltodextrin de 21. **Journal of Food Engineering**, v. 119, n. 4, p. 809–813, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.06.045>.

DESHMUKH, Nishigandha *et al.* Waste to nutrition: The evolution of whey, a byproduct to galactooligosaccharides production. **Food Chemistry Advances** Elsevier Ltd, , 1 jun. 2024. <https://doi.org/10.1016/j.focha.2024.100642>.

DI SANTO, Mariana Carolina *et al.* Chitosan-tripolyphosphate nanoparticles designed to encapsulate polyphenolic compounds for biomedical and pharmaceutical applications – A review. **Biomedicine and Pharmacotherapy** Elsevier Masson s.r.l., , 1 out. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111970>.

DÍAZ VERGARA, Ladislao I. *et al.* Chitosan-glucose derivative as effective wall material for probiotic yeasts microencapsulation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 253, 31 dez. 2023. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.127167>.

DOMINGUES, Lucília *et al.* Production of β -galactosidase from recombinant *Saccharomyces cerevisiae* grown on lactose. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 79, n. 8, p. 809–815, ago. 2004. <https://doi.org/10.1002/jctb.1025>.

DUTRA ROSOLEN, Michele *et al.* Lactose Hydrolysis in Milk and Dairy Whey Using Microbial β -Galactosidases. **Enzyme Research**, v. 2015, p. 1–7, 26 out. 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/806240>.

EBERSBACH, Hilmar; GEISSE, Sabine. Antigen generation and display in therapeutic antibody drug discovery - a neglected but critical player. **Biotechnology Journal**, v. 7, n. 12, p. 1433–1443, dez. 2012. <https://doi.org/10.1002/biot.201200066>.

EL-GINDY, A. Production, Partial Purification and Some Properties of β -Galactosidase from *Aspergillus carbonarius*. **Folia Microbiol.**, v. 48, n. 5, p. 581–584, 2003. <https://doi.org/10.1007/BF02993462>.

FAN, Xiyang *et al.* Integrated purification of a nanobody using ammonium sulfate precipitation and Capto MMC. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 95, n. 1, p. 246–254, 1 jan. 2020. <https://doi.org/10.1002/jctb.6228>.

FARKADE, Vivek D.; HARRISON, Sue; PANDIT, Aniruddha B. Heat induced translocation of proteins and enzymes within the cell: An effective way to optimize the microbial cell disruption process. **Biochemical Engineering Journal**, v. 23, n. 3, p. 247–257, 1 maio 2005. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2005.01.001>.

FERNANDES, S. *et al.* β -Galactosidase from a cold-adapted bacterium: Purification, characterization and application for lactose hydrolysis. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 58, n. 3, p. 313–321, 2002. <https://doi.org/10.1007/s00253-001-0905-4>.

FERREIRA ROSA, Paula Rúbia; SANTOS, Samantha Christine; SILVA, Edson Luiz. Different ratios of carbon sources in the fermentation of cheese whey and glucose as substrates for hydrogen and ethanol production in continuous reactors. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 39, n. 3, p. 1288–1296, 16 jan. 2014. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2013.11.011>.

GABARDO, Sabrina *et al.* Dynamics of ethanol production from whey and whey permeate by immobilized strains of *Kluyveromyces marxianus* in batch and continuous bioreactors. **Renewable Energy**, v. 69, p. 89–96, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2014.03.023>.

GABERC-POREKAR, Vladka; MENART, Viktor. Perspectives of immobilized-metal affinity chromatography. **J. Biochem. Biophys. Methods**, v. 49, p. 335–360, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0165-022X\(01\)00207-X](https://doi.org/10.1016/S0165-022X(01)00207-X).

GENNARI, Adriano *et al.* Recombinant production in *Escherichia coli* of a β -galactosidase fused to a cellulose-binding domain using low-cost inducers in fed-batch

cultivation. **Process Biochemistry**, v. 124, p. 290–298, 1 jan. 2023. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2022.11.024>.

GHANDI, Amir *et al.* The Effect of Dryer Inlet and Outlet Air Temperatures and Protectant Solids on the Survival of *Lactococcus lactis* during Spray Drying. **Drying Technology**, v. 30, n. 14, p. 1649–1657, nov. 2012. <https://doi.org/10.1080/07373937.2012.703743>.

GHARSALLAOUI, Adem *et al.* **Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview.** **Food Research International**, nov. 2007. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2007.07.004>.

GOULA, Athanasia M.; ADAMOPOULOS, Konstantinos G. Effect of maltodextrin addition during spray drying of tomato pulp in dehumidified air: II. powder properties. **Drying Technology**, v. 26, n. 6, p. 726–737, jun. 2008. <https://doi.org/10.1080/07373930802046377>.

GUPTA, Gupteshwar *et al.* Spray-drying of xylanase from thermophilic fungus *Melanocarpus albomyces*-Effect of carriers and binders on enzyme stability. **Indian Journal of Chemical Technology**, v. 21, p. 89–95, 2014.

HARINARAYAN, C. *et al.* An exclusion mechanism in ion exchange chromatography. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 95, n. 5, p. 775–787, 5 dez. 2006. <https://doi.org/10.1002/bit.21080>.

HELJO, Ville Petteri *et al.* The use of disaccharides in inhibiting enzymatic activity loss and secondary structure changes in freeze-dried β -galactosidase during storage. **Pharmaceutical Research**, v. 28, n. 3, p. 540–552, mar. 2011. <https://doi.org/10.1007/s11095-010-0300-x>.

HUNG, M. N.; LEE, B. Purification and characterization of a recombinant β -galactosidase with transgalactosylation activity from *Bifidobacterium infantis* HL96. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 58, n. 4, p. 439–445, 2002. <https://doi.org/10.1007/s00253-001-0911-6>.

ISOBE, Kimiyasu *et al.* Characterization of new β -galactosidase from acidophilic fungus, *Teratosphaeria acidotherma* AIU BGA-1. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 116, n. 3, p. 293–297, set. 2013. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2013.03.012>.

JAFARI, Seid Mahdi; GHALEGI GHALENOEI, Malihe; DEHNAD, Danial. Influence of spray drying on water solubility index, apparent density, and anthocyanin content of pomegranate juice powder. **Powder Technology**, v. 311, p. 59–65, 15 abr. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2017.01.070>.

JAYAPRAKASH, Preethi *et al.* Impact of matrices composition and processes on β -galactosidase encapsulation. **Journal of Food Engineering**, v. 353, p. 111547, set. 2023. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2023.111547>.

JENSEN, Christopher Fisker; TIMOFEEVA, Maria; BERG-BECKHOFF, Gabriele. Milk consumption and the risk of type 2 diabetes: A systematic review of Mendelian

randomization studies. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v. 33, n. 7, p. 1316–1322, jul. 2023. <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2023.04.013>.

KARIM, Ahasanul; AIDER, Mohammed. Sustainable Valorization of Whey by Electroactivation Technology for in Situ Isomerization of Lactose into Lactulose: Comparison between Electroactivation and Chemical Processes at Equivalent Solution Alkalinity. **ACS Omega**, v. 5, n. 14, p. 8380–8392, 14 abr. 2020. <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c00913>.

KARIM, Ahasanul; AIDER, Mohammed. Bioconversion of electro-activated lactose, whey and whey permeate to produce single cell protein, ethanol, aroma volatiles, organic acids and fat by *Kluyveromyces marxianus*. **International Dairy Journal**, v. 129, 1 jun. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2022.105334>.

KAUR, Rupinder; PANWAR, Divyani; PANESAR, Parmjit S. Biotechnological approach for valorization of whey for value-added products. **Food Industry Wastes: Assessment and Recuperation of Commodities**, p. 275–302, 1 jan. 2020. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817121-9.00013-9>.

KAVITAKE, Digambar et al. Recent developments on encapsulation of lactic acid bacteria as potential starter culture in fermented foods – A review. *Food Bioscience*, v. 21, p. 34–44, 1 fev. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2017.11.003>.

KHAYATI, Gholam; ANVARI, Masumeh; SHAHIDI, Nushin. Partitioning of β -galactosidase in aqueous two-phase systems containing polyethyleneglycol and phosphate salts. **Fluid Phase Equilibria**, v. 385, p. 147–152, 5 jan. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.fluid.2014.11.003>.

KOUSHKI, Mohammadreza; JAFARI, Mojtaba; AZIZI, Mohammadhosein. Comparison of ethanol production from cheese whey permeate by two yeast strains. **Journal of Food Science and Technology**, v. 49, n. 5, p. 614–619, out. 2012. <https://doi.org/10.1007/s13197-011-0309-0>.

LAKSHMI, B. K. M.; MUNI KUMAR, D.; HEMALATHA, K. P. J. Purification and characterization of alkaline protease with novel properties from *Bacillus cereus* strain S8. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 16, n. 2, p. 295–304, 1 dez. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2018.05.009>.

LAVARI, Luisina *et al.* Growth of *Lactobacillus rhamnosus* 64 in whey permeate and study of the effect of mild stresses on survival to spray drying. **LWT**, v. 63, n. 1, p. 322–330, 1 set. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.03.066>.

LEMES, Ailton C. *et al.* Design strategies for integrated β -galactosidase purification processes. **Chemical Engineering and Technology**, v. 37, n. 10, p. 1805–1812, 1 out. 2014. <https://doi.org/10.1002/ceat.201300433>.

LI, Aili *et al.* Health implication of lactose intolerance and updates on its dietary management. **International Dairy Journal**, v. 140, p. 105608, maio 2023a. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2023.105608>.

LI, Aili *et al.* Advances in Low-Lactose/Lactose-Free Dairy Products and Their Production. **Foods**, v. 12, n. 13, p. 2553, 29 jun. 2023b. <https://doi.org/10.3390/foods12132553>.

LIENQUEO, M. Elena *et al.* Current insights on protein behaviour in hydrophobic interaction chromatography. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 849, n. 1–2, p. 53–68, 15 abr. 2007. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2006.11.019>.

LIMA, Micael de Andrade *et al.* Recovery and purification of a *Kluyvermyces lactis* β -galactosidase by Mixed Mode Chromatography. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 1015–1016, p. 181–191, 15 mar. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.01.053>.

LIN, Yi Chen; TSENG, Hui Hsin; WANG, David K. Uncovering the effects of PEG porogen molecular weight and concentration on ultrafiltration membrane properties and protein purification performance. **Journal of Membrane Science**, v. 618, 15 jan. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2020.118729>.

LIPIÄINEN, Tiina *et al.* Comparison of melibiose and trehalose as stabilising excipients for spray-dried β -galactosidase formulations. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 543, n. 1–2, p. 21–28, 30 maio 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.03.035>.

LOPES, Ana R. *et al.* Production of microparticles of molinate degrading biocatalysts using the spray drying technique. **Chemosphere**, v. 161, p. 61–68, 1 out. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.07.006>.

MAJORE, Kristine; CIPROVICA, Inga. Sensory Assessment of Bi-Enzymatic-Treated Glucose-Galactose Syrup. **Fermentation**, v. 9, n. 2, 1 fev. 2023. <https://doi.org/10.3390/fermentation9020136>.

MANO, Mario Cezar Rodrigues; PAULINO, Bruno Nicolau; PASTORE, Gláucia Maria. Whey permeate as the raw material in galacto-oligosaccharide synthesis using commercial enzymes. **Food Research International**, v. 124, p. 78–85, 1 out. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.09.019>.

MANZANARES, Paloma; DE GRAAFF, Leo H.; VISSER, Jaap. Characterization of galactosidases from *Aspergillus niger*: purification of a novel-galactosidase activity. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 22, p. 383–390, 1998. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(97\)00207-X](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(97)00207-X).

MARIM, Aline Vitória Corim; GABARDO, Sabrina; AYUB, Marco Antônio Záchia. **Porungo cheese whey: β -galactosidase production, characterization and lactose hydrolysis**. Brazilian Journal of Food Technology, v. 24, 2021. <https://doi.org/10.1590/1981-6723.03821>.

MARTARELLO, Raquel Dall'Agnol *et al.* Optimization and partial purification of beta-galactosidase production by *Aspergillus niger* isolated from Brazilian soils using soybean residue. **AMB Express**, v. 9, n. 1, 1 dez. 2019. <https://doi.org/10.1186/s13568-019-0805-6>.

MARTINS, E. *et al.* Determination of ideal water activity and powder temperature after spray drying to reduce *Lactococcus lactis* cell viability loss. **Journal of Dairy Science**, v. 102, n. 7, p. 6013–6022, 1 jul. 2019. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-16297>.

MEGHWANSHI, Gautam Kumar *et al.* Enzymes for pharmaceutical and therapeutic applications. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 67, n. 4, p. 586–601, 1 jul. 2020. <https://doi.org/10.1002/bab.1919>.

MOEJES, S. N. *et al.* Closed-loop spray drying solutions for energy efficient powder production. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 47, p. 24–37, 1 jun. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2018.01.005>.

MOHTAR, Nur Syazwani *et al.* Spray-dried immobilized lipase from *Geobacillus* sp. strain ARM in sago. **PeerJ**, v. 2019, n. 5, 2019. <https://doi.org/10.7717/peerj.6880>.

MOVAHEDPOUR, Ahmad *et al.* β -Galactosidase: From its source and applications to its recombinant form. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 69, n. 2, p. 612–628, 1 abr. 2022. <https://doi.org/10.1002/bab.2137>.

MUKUNDAN, Soumya *et al.* Enhancement in β -galactosidase activity of *Streptococcus lactis* cells by entrapping in microcapsules comprising of correlated silica nanoparticles. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 195, 1 nov. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2020.111245>.

NADAR, Shamraja S.; PAWAR, Rohini G.; RATHOD, Virendra K. Recent advances in enzyme extraction strategies: A comprehensive review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 101, p. 931–957, 1 ago. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.03.055>.

NAGY, Zoltán *et al.* β -galactosidase of *Penicillium chrysogenum*: Production, purification, and characterization of the enzyme. **Protein Expression and Purification**, v. 21, n. 1, p. 24–29, 2001. <https://doi.org/10.1006/prep.2000.1344>.

NARAHARI, C. R. *et al.* Purification of recombinant green fluorescent protein using chromatofocusing with a pH gradient composed of multiple stepwise fronts. **Biotechnology Progress**, v. 17, n. 1, p. 150–160, 1 jan. 2001. <https://doi.org/10.1021/bp0001415>.

NEWTON, Matilda S. *et al.* Enzyme evolution: innovation is easy, optimization is complicated. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 48, p. 110–116, 1 fev. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2017.11.007>.

NGUYEN, Thu Ha *et al.* Purification and characterization of two novel β -galactosidases from *Lactobacillus reuteri*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 14, p. 4989–4998, 12 jul. 2006. <https://doi.org/10.1021/jf053126u>.

NGUYEN, Hoang Hiep; KIM, Moonil. An Overview of Techniques in Enzyme Immobilization. **Applied Science and Convergence Technology**, v. 26, n. 6, p. 157–163, 30 nov. 2017. <https://doi.org/10.5757/ASCT.2017.26.6.157>.

NGUYEN, Vuong D. *et al.* Immobilization of β -galactosidase on chitosan-coated magnetic nanoparticles and its application for synthesis of lactulose-based

galactooligosaccharides. **Process Biochemistry**, v. 84, p. 30–38, 1 set. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.05.021>

NUMANOĞLU, Yasemin; SUNGUR, Sibel. β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* cell disruption and enzyme immobilization using a cellulose-gelatin carrier system. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 6, p. 705–711, 25 fev. 2004. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(03\)00183-3](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(03)00183-3).

O'CONNELL, S.; WALSH, G. Application relevant studies of fungal β -galactosidases with potential application in the alleviation of lactose intolerance. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 149, n. 2, p. 129–138, maio 2008. <https://doi.org/10.1007/s12010-007-8098-7>.

O'CONNELL, Shane; WALSH, Gary. A novel acid-stable, acid-active β -galactosidase potentially suited to the alleviation of lactose intolerance. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 86, n. 2, p. 517–524, mar. 2010. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2270-7>.

O'DONOGHUE, Laura T.; MURPHY, Eoin G. Nondairy food applications of whey and milk permeates: Direct and indirect uses. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 22, n. 4, p. 2652–2677, 1 jul. 2023. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.13157>.

Ó'FÁGÁIN, Ciarán; CUMMINS, Philip M.; O'CONNOR, Brendan. Gel-filtration chromatography. In: **Methods in Molecular Biology**. [S.l.]: Humana Press Inc., 2017. v. 1485 p. 15–25. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6412-3_2.

OLIVEIRA, Luiza Scalcon de *et al.* The use of probiotics and prebiotics can enable the ingestion of dairy products by lactose intolerant individuals. **Clinical Nutrition**, v. 41, n. 12, p. 2644–2650, dez. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2022.10.003>.

OLIVEIRA DE MEDEIROS, F.; VEIGA BURKERT, C. A.; JULIANO KALIL, S. Purification of β -Galactosidase by Ion Exchange Chromatography: Elution Optimization Using an Experimental Design. **Chemical Engineering and Technology**, v. 35, n. 5, p. 911–918, maio 2012. <https://doi.org/10.1002/ceat.201100571>.

ORREGO, David; KLOTZ-CEBERIO, Bernadette. Enzymatic Synthesis of Galacto-Oligosaccharides from Concentrated Sweet Whey Permeate and Its Application in a Dairy Product. **Applied Sciences (Switzerland)**, v. 12, n. 20, 1 out. 2022. <https://doi.org/10.3390/app122010229>.

PANESAR, Parmjit S. *et al.* Microbial production, immobilization and applications of β -D-galactosidase. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 81, n. 4, p. 530–543, abr. 2006. <https://doi.org/10.1002/jctb.1453>.

PANESAR, Parmjit S. *et al.* Bioutilisation of whey for lactic acid production. **Food Chemistry**, v. 105, n. 1, p. 1–14, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.03.035>.

PARASHAR, Archana *et al.* Incorporation of whey permeate, a dairy effluent, in ethanol fermentation to provide a zero waste solution for the dairy industry. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 3, p. 1859–1867, 1 mar. 2016. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10059>.

PEARLMAN, Michelle; AKPOTAIRE, Oviea. Diet and the Role of Food in Common Gastrointestinal Diseases. **Medical Clinics of North America**, v. 103, n. 1, p. 101–110, jan. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2018.08.008>.

PEREIRA, Jorge F. B.; FREIRE, Mara G.; COUTINHO, João A. P. Aqueous two-phase systems: Towards novel and more disruptive applications. **Fluid Phase Equilibria**, v. 505, 1 fev. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.fluid.2019.112341>.

PIÑÓN-BALDERRAMA, Claudia I. *et al.* Encapsulation of active ingredients in food industry by spray-drying and nano spray-drying technologies. **Processes**, v. 8, n. 8, 1 ago. 2020. <https://doi.org/10.3390/pr8080889>.

QIU, Yibin *et al.* Kluyveromyces as promising yeast cell factories for industrial bioproduction: From bio-functional design to applications. **Biotechnology Advances**, v. 64, 1 maio 2023. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2023.108125>.

QURESHI, N.; FRIEDL, A.; MADDOX, I. S. Butanol production from concentrated lactose/whey permeate: Use of pervaporation membrane to recover and concentrate product. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 23, p. 9859–9867, 15 nov. 2014. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6117-5>.

RABIEI, Samira *et al.* Consumption of milk and dairy products in Iranian population; barriers and facilitators. **Clinical Nutrition Open Science**, v. 38, p. 1–23, ago. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.nutos.2021.05.002>.

REDDY, Kanchi Bhasker Praveen Kumar; MADHU, Arenahalli Ningegowda; PRAPULLA, Siddalingaiya Gurudutt. Comparative survival and evaluation of functional probiotic properties of spray-dried lactic acid bacteria: ORIGINAL RESEARCH. **International Journal of Dairy Technology**, v. 62, n. 2, p. 240–248, maio 2009. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2009.00480.x>.

RIBEIRO, Adrielle Aparecida Paulista *et al.* An Approach for Using Non-purified β -Galactosidase: The Potential of β -Galactosidase in Kluyveromyces marxianus Cell Microparticles with Different Wall Materials. **Food and Bioprocess Technology**, 2024. <https://doi.org/10.1007/s11947-024-03427-8>.

RISNER, Derrick *et al.* The potential production of the bioactive compound pinene using whey permeate. **Processes**, v. 8, n. 3, 1 mar. 2020. <https://doi.org/10.3390/pr8030263>.

SALLEH, Hamzah Mohd et al. Mohamed Saedi Jami, Azura Amid, Muntari Balac., **Optimization of Spray Drying Process Conditions for Recombinant Stem Bromelain**. *Advances in Environmental Biology*, v. 8, n. 3, p. 696–703, 2014.

SAMANTHA, Serra Costa *et al.* Drying by spray drying in the food industry: Micro-encapsulation, process parameters and main carriers used. **African Journal of Food Science**, v. 9, n. 9, p. 462–470, 30 set. 2015. <https://doi.org/10.5897/AJFS2015.1279>.

SAMBORSKA, Katarzyna; WITROWA-RAJCHERT, Dorota; GONÇALVES, Andre. **Spray-drying of α -amylase - The effect of process variables on the enzyme inactivation.** *Drying Technology*, v. 23, n. 4, p. 941–953, 2005. <https://doi.org/10.1081/DRT-200054243>.

SANTANA, Audirene et al. **Spray drying of pequi pulp: Process performance and physicochemical and nutritional properties of the powdered pulp.** *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 59, 2016. <https://doi.org/10.1590/1678-4324-2016150362>.

SAQIB, Shaima *et al.* Sources of β -galactosidase and its applications in food industry. **3 Biotech**, v. 7, n. 1, 1 maio 2017. <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0645-5>.

SATO, Vanessa Sayuri *et al.* Phytase Production by *Rhizopus microsporus* var. *microsporus* Biofilm: Characterization of Enzymatic Activity After Spray Drying in Presence of Carbohydrates and Nonconventional Adjuvants. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, n. 2, p. 177–187, 28 fev. 2014. <https://doi.org/10.4014/jmb.1308.08087>.

SHI, Xin *et al.* Engineering the optimum pH of β -galactosidase from *Aspergillus oryzae* for efficient hydrolysis of lactose. **Journal of Dairy Science**, v. 105, n. 6, p. 4772–4782, 1 jun. 2022. <https://doi.org/10.3168/jds.2021-21760>.

SIEMONS, I. *et al.* Dextrose equivalence of maltodextrins determines particle morphology development during single sessile droplet drying. **Food Research International**, v. 131, 1 maio 2020. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.108988>.

SILVA, Eric Keven *et al.* Non-thermal microbial inactivation by using supercritical carbon dioxide: Synergic effect of process parameters. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 139, p. 97–104, 1 set. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2018.05.013>.

SINGH, Rahul Vikram; SAMBYAL, Krishika. β -galactosidase as an industrial enzyme: production and potential. **Chemical Papers**, v. 77, n. 1, p. 11–31, 1 jan. 2023. <https://doi.org/10.1007/s11696-022-02507-3>.

SRIVASTAVA, Gopal *et al.* Tartrate/tripolyphosphate as co-crosslinker for water soluble chitosan used in protein antigens encapsulation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 91, p. 381–393, 1 out. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.05.099>

SURESH, Gayatri *et al.* Production and in-vitro evaluation of an enzyme formulation as a potential alternative to feed antibiotics in poultry. **Process Biochemistry**, v. 80, p. 9–16, 1 maio 2019. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.01.023>.

SUVARLI, Narmin et al. **Immobilization of β -Galactosidase by Encapsulation of Enzyme-Conjugated Polymer Nanoparticles Inside Hydrogel Microparticles.** *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, v. 9, 13 jan. 2022. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.818053>.

SZILAGYI, Andrew; ISHAYEK, Norma. Lactose Intolerance, Dairy Avoidance, and Treatment Options. **Nutrients**, v. 10, n. 12, p. 1994, 15 dez. 2018. <https://doi.org/10.3390/nu10121994>.

SZUDERA-KONCZAL, Kamila *et al.* The Use of Sour and Sweet Whey in Producing Compositions with Pleasant Aromas Using the Mold *Galactomyces geotrichum*: Identification of key odorants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 68, n. 39, p. 10799–10807, 30 set. 2020. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c03979>.

TODOROVA-BALVAY, Daniela *et al.* An efficient two step purification and molecular characterization of β -galactosidases from *Aspergillus oryzae*. **Journal of Molecular Recognition**, v. 19, n. 4, p. 299–304, jul. 2006. <https://doi.org/10.1002/jmr.788>.

TOMMASO, Giovana *et al.* Production of Lipase from *Candida rugosa* Using Cheese Whey through Experimental Design and Surface Response Methodology. **Food and Bioprocess Technology**, v. 4, n. 8, p. 1473–1481, nov. 2011. <https://doi.org/10.1007/s11947-010-0432-3>.

URETA, Maria Micaela *et al.* **Recent advances in β -galactosidase and fructosyltransferase immobilization technology**. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, v. 61, n. 16, p. 2659–2690, 2021. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1783639>.

VAN DEN DUNGEN, Myrthe W. *et al.* The safety of a *Kluyveromyces lactis* strain lineage for enzyme production. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 126, p. 105027, nov. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2021.105027>.

VASILJEVIC, T.; JELEN, Paul. Retention of β -galactosidase activity in crude cellular extracts from *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* 11842 upon drying. **International Journal of Dairy Technology**, v. 56, n. 2, p. 111–116, maio 2003. <https://doi.org/10.1046/j.1471-0307.2003.00090.x>.

WANG, Huan *et al.* Effect of the condition of spray-drying on the properties of the polypeptide-rich powders from enzyme-assisted aqueous extraction processing. **Drying Technology**, v. 37, n. 16, p. 2105–2115, 10 dez. 2019. <https://doi.org/10.1080/07373937.2018.1563104>.

WEN, Peng *et al.* **Electrospinning: A novel nano-encapsulation approach for bioactive compounds**. **Trends in Food Science and Technology** Elsevier Ltd, , 1 dez. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.10.009>.

WENG, Yilun *et al.* **Alginate Particles for Enzyme Immobilization Using Spray Drying**. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 70, n. 23, p. 7139–7147, 15 jun. 2022. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.2c02298>.

WILKOWSKA, Agnieszka *et al.* Growth and by-product profiles of *Kluyveromyces marxianus* cells immobilized in foamed alginate. **Yeast**, v. 32, n. 1, p. 217–225, 1 jan. 2015. <https://doi.org/10.1002/yea.3044>.

WILSON, Lorena *et al.* Co-immobilized carrier-free enzymes for lactose upgrading. **Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry**, v. 33, 1 fev. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.cogsc.2021.100553>.

WITTWER, Anna Elizabeth; LEE, Simon Gardner; RANADHEERA, Chaminda Senaka. Potential associations between organic dairy products, gut microbiome, and gut health:

A review. **Food Research International**, v. 172, p. 113195, out. 2023. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2023.113195>.

WU, Yuanbing *et al.* **Chitosan-Based drug delivery system: Applications in fish biotechnology**. **PolymersMDPI AG**, , 1 maio 2020. <https://doi.org/10.3390/polym12051177>.

XAVIER, Janifer Raj; RAMANA, Karna Venkata; SHARMA, Rakesh Kumar. β -galactosidase: Biotechnological applications in food processing. **Journal of Food Biochemistry**, v. 42, n. 5, 1 out. 2018. <https://doi.org/10.1111/jfbc.12564>.

YADAV, Jay Shankar Singh *et al.* Cheese whey: A potential resource to transform into bioprotein, functional/nutritional proteins and bioactive peptides. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 6, p. 756–774, 1 nov. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.07.002>.

YANG, Jinchuan *et al.* Determination of lactose in low-lactose and lactose-free dairy products using LC-MS. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 100, p. 103824, jul. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2021.103824>.

YENKIE, Kirti M.; WU, Wenzhao; MARAVELIAS, Christos T. Synthesis and analysis of separation networks for the recovery of intracellular chemicals generated from microbial-based conversions. **Biotechnology for Biofuels**, v. 10, n. 1, 8 maio 2017. <https://doi.org/10.1186/s13068-017-0804-2>.

YOU, Shengping *et al.* Utilization of whey powder as substrate for low-cost preparation of B-galactosidase as main product, and ethanol as by-product, by a litre-scale integrated process. **Bioresource Technology**, v. 245, p. 1271–1276, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.08.092>.

ZABOT, Giovani Leone *et al.* **Encapsulation of Bioactive Compounds for Food and Agricultural Applications**. **PolymersMDPI**, ,1 out. 2022. <https://doi.org/10.3390/polym14194194>.

ZUBA-CISZEWSKA, Maria *et al.* Lactose-free products: A study of young Polish consumers' knowledge and purchase behaviour. **Article in Songklanakarin Journal of Science and Technology**, v. 44, n. 3, p. 619–626, 2022.

CAPÍTULO 2 - RECUPERAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE β -GALACTOSIDASE DE DIFERENTES FONTES MICROBIANAS

RESUMO: A enzima β -galactosidase, responsável pela hidrólise da lactose, pode ser obtida de células animais, vegetais ou pela produção por microrganismos via fermentativa a partir de leveduras, fungos e bactérias. Esse tipo de produção tem criado uma crescente demanda por sistemas eficientes de recuperação e purificação de enzimas, especialmente quando são produtos intracelulares, como a β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus*. Esse estudo teve como objetivo compilar informações, por meio de uma revisão sistemática da literatura, sobre as principais técnicas de purificação da enzima β -galactosidase. Esse trabalho é uma revisão bibliográfica de caráter qualitativo descritivo. Foram reunidos trabalhos científicos publicados nas plataformas digitais: periódicos da CAPES, Web of Science, Google Acadêmico, Scielo (Scientific Electronic Library Online) e Science Direct. Os métodos de purificação mais observados na literatura foram precipitação com sulfato de amônio, cromatografia de troca iônica, cromatografia de interação hidrofóbica, cromatografia de filtração em gel, ultrafiltração e secagem por *spray drying*. A secagem por *spray drying* mostrou-se mais vantajosa em relação aos demais métodos pois não requer nenhuma outra etapa, como rompimento da parede celular para enzimas intracelulares, dessa forma já se obtém a enzima seca. Ainda, na presente revisão notou-se uma ampla preocupação dos pesquisadores em obter cada vez mais uma melhor otimização dos processos de purificação com foco em manter a atividade enzimática da β -galactosidase com redução de custos do processo com as operações unitárias.

Palavras-chave: Fermentação, *spray drying*, atividade enzimática, enzima intracelular.

ABSTRACT: The enzyme β -galactosidase, responsible for lactose hydrolysis, can be obtained from animal and plant cells, or produced by microorganisms via fermentation from yeast, fungi, and bacteria. This type of production has created a growing demand for efficient enzyme recovery and purification systems, especially for intracellular products, such as β -galactosidase from *Kluyveromyces marxianus*. This study aimed to compile information, through a systematic literature review, on the main purification techniques for the enzyme β -galactosidase. This work is a qualitative and descriptive literature review. Scientific papers published in the following digital platforms were collected: CAPES journals, Web of Science, Google Scholar, Scielo (Scientific Electronic Library Online), and Science Direct. The most frequently observed purification methods in the literature were ammonium sulfate precipitation,

ion exchange chromatography, hydrophobic interaction chromatography, gel filtration chromatography, ultrafiltration, and spray drying. Spray drying proved to be more advantageous than the other methods because it does not require any additional steps, such as cell wall disruption for intracellular enzymes, thus obtaining a dry enzyme. Furthermore, this review noted a broad concern among researchers to increasingly optimize purification processes, focusing on maintaining β -galactosidase enzymatic activity while reducing process costs with unit operations.

Keywords: Fermentation, spray drying, enzymatic activity, intracellular enzyme.

2.1 INTRODUÇÃO

As enzimas são proteínas que possuem funções catalíticas altamente especializadas e possuem um papel crucial para todos os processos metabólicos (VAN DEN DUNGEN et al., 2021). Além disso, desempenham um papel importante em diversos setores industriais, isso inclui alimentos, produtos farmacêuticos, ambiental e biotecnológicos. Dentre elas, a β -galactosidase tem recebido atenção significativa devido à sua ampla aplicação e crescente demanda (MAJORE; CIPROVICA, 2023).

A enzima β -galactosidase (β -D-galactosídeo-galacto-hidrolase, EC 3.2.1.23) é responsável por catalisar a hidrólise da ligação glicosídica da lactose, liberando os monossacarídeos glicose e galactose. Essa reação é importante na indústria alimentícia, pois permite a produção de alimentos com baixo teor de lactose ou sem lactose, promovendo melhorias na digestibilidade, solubilidade, doçura e sabor dos produtos lácteos (GENNARI et al., 2023). A β -galactosidase também é capaz de produzir galactoligossacarídeos (GOS), através de sua atividade de transglicosilação. Os GOS são prebióticos não digeríveis típicos, auxiliam em diversos aspectos na saúde humana como na estimulação do crescimento de bactérias intestinais benéficas, reduzem a carga de bactérias patogênicas, melhoram a função do sistema imunológico e previnem o câncer (MOVAHEDPOUR et al., 2022).

A β -galactosidase pode ser obtida de células animais, vegetais ou pela produção por microrganismos via fermentativa a partir de leveduras, como *Kluyveromyces lactis*, *K. fragilis*, *Candida pseudotropicalis* e muitas bactérias, como *Lactobacillus bulgaricus*, *Escherichia coli*, *Bacillus sp* e *Streptococcus lactis*. Pode ser produzida também pela enorme população de fungos, como *Aspergillus oryzae*, *A. foetidus*, *A. niger* e *A. phoenecia*. A produção de β -galactosidase a partir de microrganismos é obtida através de processos fermentativos e requer o desenvolvimento de um meio fermentativo eficiente que garanta alta produção de enzimas (BANO et al., 2021; CHOONIA; LELE, 2013).

As enzimas oriundas de microrganismos têm sido tradicionalmente obtidas a partir de fermentação submersa e fermentação em estado sólido (DE JESUS; GUIMARÃES, 2021). Como resultado dessa fermentação, a enzima pode ser produzida de forma intracelular ou extracelular, dependendo do microrganismo. As bactérias como *Lactobacillus thermophilus*, *Escherichia coli*, *Bacillus circulans* e *Leuconostoc citrovorum* e leveduras como a *Kluyveromyces lactis*, *K. fragilis* são produtores de β -galactosidase intracelular e os fungos como o *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus foetidus* e *Neurospora crassa* extracelulares. Esse tipo de produção tem criado uma crescente demanda por sistemas eficientes de recuperação de materiais, especialmente quando são produzidos intracelularmente (SAQIB et al., 2017).

A recuperação de enzimas intracelulares envolve o uso de operações convencionais de ruptura celular, centrifugação e ultrafiltração (MEDEIROS; BURKERT; KALIL, 2012). Para a purificação diversas técnicas têm sido empregadas, e deve-se considerar além de suas características intrínsecas, a escolha das operações unitárias adequadas para cada etapa do processo visando sempre a preservação do produto e operações econômicas viáveis, podendo assim integrar uma ou mais técnicas. Os métodos tradicionais de purificação de proteínas envolvem etapas como precipitação com sulfato de amônio, cromatografia de íons e afinidade, diálise e concentração final do produto (LEMES et al., 2014).

A purificação de enzimas é um fator importante para desenvolver um produto eficiente e competitivo no mercado. O grau de purificação vai depender, além das características do produto fermentado, da aplicabilidade de cada enzima como na área ambiental, alimentícia e farmacológica. Os custos relativos aos processos de *downstream* podem alcançar até 70% dos custos totais da fabricação da enzima (LAKSHMI; MUNI KUMAR; HEMALATHA, 2018). Com isso, há uma crescente demanda no desenvolvimento de estudos e técnicas de separação e purificação mais econômicas, brandas e integradas, visando sempre um número mínimo de etapas e a maior preservação das propriedades das enzimas (NADAR; PAWAR; RATHOD, 2017).

Sendo assim, diversos estudos com interesse na redução de custos e otimização dos processos das etapas de *downstream* têm sido elaborados ao longo dos anos, para diversas enzimas, inclusive a β -galactosidase. Embora exista uma ampla variedade de trabalhos na literatura descrevendo métodos de recuperação e purificação dessa enzima, esses estudos muitas vezes estão dispersos, adotando diferentes abordagens, fontes microbianas, técnicas e condições operacionais, o que dificulta a visão integrada do estado da arte. Dessa forma, revisões sistemáticas da literatura tornam-se essenciais para consolidar o conhecimento disponível, comparar metodologias, identificar tendências e lacunas, além de fornecer subsídios para o desenvolvimento de processos mais eficientes e economicamente viáveis. Tendo em vista a relevância dessa enzima para a indústria de alimentos e farmacológica e os custos com sua produção, esse estudo tem como objetivo compilar informações e analisá-las criticamente, por meio de uma revisão sistemática da literatura das principais técnicas de purificação da enzima β -galactosidase.

2.2 METODOLOGIA

Esse trabalho é uma revisão bibliográfica de caráter qualitativo descritivo. Foram reunidos trabalhos científicos publicados nas plataformas digitais: periódicos da Capes, Web of Science, Google Acadêmico, Scielo (Scientific Electronic Library Online) e Science Direct. As palavras chaves utilizadas na pesquisa foram: *purification of enzyme*, *purification of β -galactosidase*, *protein recovery and purification*, *enzyme recovery and purification*, *β -galactosidase drying*, *β -galactosidase spray drying*, *β -galactosidase freeze drying*. Os períodos dos artigos variaram entre os anos de 1998 e 2023.

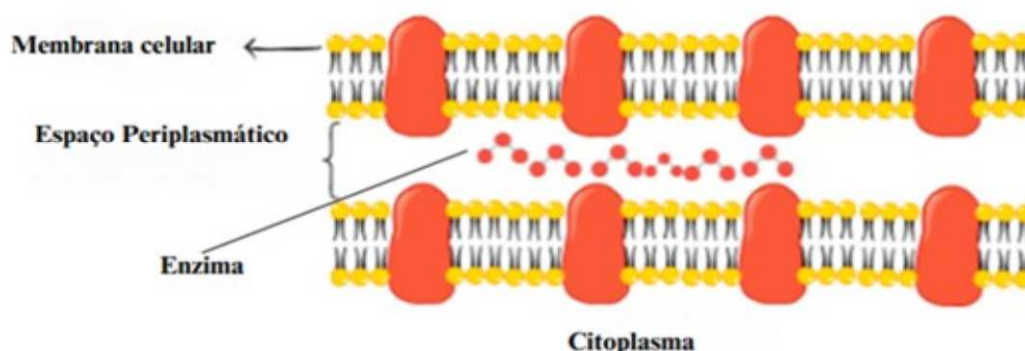
3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

2.3.1 Produção da β -galactosidase

As β -galactosidasas podem ser de origem vegetal, animal ou microbiana (levedura, bactéria e fungo), sendo as enzimas que apresentam maior produtividade e rendimento as microbianas e ainda podem ser produzidas com redução de custos. Estas enzimas devem provir de microrganismos “Geralmente Reconhecidos como Seguros” (GRAS) (DUTRA ROSOLEN et al., 2015). As enzimas são submetidas a testes extensivos antes de serem aplicadas na indústria alimentícia e farmacêutica, por exemplo, apesar da *Escherichia coli* servir de modelo de estudo do mecanismo de ação da β -galactosidase, ela não é considerada segura para uso em alimentos devido a problemas de toxicidade associados ao hospedeiro (PANESAR et al., 2006).

Diversos microrganismos produzem enzimas em localização extracelular, entretanto outros as produzem intracelularmente, como na região do periplasma, citoplasma e ligados à membrana celular, nesse caso é necessária uma ruptura celular para a recuperação dessa enzima, acarretando um custo adicional ao processo de recuperação (BALASUNDARAM; PANDIT, 2001). A ruptura da parede celular e da membrana citoplasmática podem ocorrer por métodos físicos como homogeneizador de alta pressão e moinhos de esferas, químicos ou enzimáticos. Os métodos físicos oferecem algumas vantagens devido às limitações econômicas e operacionais serem menores em comparação com os demais (BALASUNDARAM; PANDIT, 2001; FARKADE; HARRISON; PANDIT, 2005). Na Figura 2.1 está mostrado o esquema da localização intracelular de compostos sintetizados por microrganismos.

Figura 2.1 - Representação da localização intracelular da expressão de β -galactosidases em microrganismos.



Fonte: Elaborado pelos autores, 2025.

Na Tabela 2.1 são citados alguns estudos dos microrganismos que produzem a β -galactosidase de forma intracelular ou extracelular, bem como as características e condições ambientais ideais para atividade enzimática. Na Tabela são apresentados os principais microrganismos produtores de β -galactosidase incluem *Kluyveromyces marxianus*, *Escherichia coli* e *Lactobacillus spp.*, amplamente utilizados devido à sua capacidade de síntese da enzima em diferentes condições ambientais (PANESAR et al., 2006). Todavia, outros microrganismos também demonstram potencial para a produção de β -galactosidase, como *Bacillus circulans*, *Aspergillus oryzae* e *Saccharomyces fragilis* (DOMINGUES et al., 2004; SAQIB et al., 2017; RAMANA; SHARMA, 2018; BELLAOUCHI et al., 2021). A ampla diversidade de fontes microbianas contribui para a funcionalidade e estabilidade da β -galactosidase, isso amplia suas aplicações em diferentes processos industriais e permite a seleção do microrganismo mais adequada para cada fim.

Tabela 2.1 - Propriedades da β -galactosidase produzidas por diferentes microrganismos e as características e condições ambientais

Microrganismo produtor	Localização celular	pH e temperatura ideal	Aplicabilidade em laticínios	Referência
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Intracelular	Atividade ideal em pH próximo a neutralidade, termotolerante (55°C).	Adequado para hidrólise de leite (pH 6,8) e soro de leite doce (pH 6,2).	(OLIVEIRA DE MEDEIROS; VEIGA BURKERT; JULIANO KALIL, 2012; SAQIB et al., 2017; WILKOWSKA et al., 2015)
<i>Kluyveromyces lactis</i>	Intracelular	Atividade ideal em pH 6,8 a 7 e temperatura entre 30-35°C.	Adequada para tratar leite (pH 6,8) e soro de leite doce (pH 6,2)	(XAVIER; RAMANA; SHARMA, 2018)
<i>Kluyveromyces fragilis</i>	Intracelular	Atividade em pH entre 3 e 7 e temperatura entre 30-35°C.	Ideal para hidrólise de lactose em soro de leite ácido (pH 4,6).	(XAVIER; RAMANA; SHARMA, 2018)
<i>Aspergillus oryzae</i>	Extracelular	Atividade em pH ótimo de 4,5 e temperatura ótima de 55–60 °C.	Hidrólise da lactose do soro ácido (pH 4,6)	(SAQIB et al., 2017; SHI et al., 2022)
<i>Aspergillus niger</i>	Extracelular	São termolábeis com pH ótimo para hidrólise de lactose entre 4,0 e 6,0.	Permite hidrólise da lactose em temperaturas altas (55°C).	(BELLAOUCHI et al., 2021; XAVIER; RAMANA; SHARMA, 2018)
<i>Bacillus circulans</i>	Intracelular	Atividade ideal em pH 6,5 e temperatura 56°C.	Permite hidrólise da lactose em leite e soro de leite doce em temperaturas altas (56°C).	(DOMINGUES et al., 2004; Saqib et al., 2017)

2.3.2 Principais métodos de recuperação e purificação da β -galactosidase

Após a produção da enzima por meio de microrganismos, utilizam-se algumas operações unitárias que possuem o intuito de recuperar e posteriormente se necessário purificar a enzima. Cada operação unitária desempenha uma função específica no processo global de recuperação e purificação, que auxiliam na separação das enzimas dos componentes indesejáveis. No geral, pode ser ter etapas para a obtenção do produto final são: clarificação, rompimento de células, purificação de baixa resolução, purificação de alta resolução e tratamentos finais (NADAR; PAWAR; RATHOD, 2017).

A clarificação consiste na separação das células e seus fragmentos do meio de cultivo, como a filtração convencional e tangencial e a centrifugação. O processo de rompimento é necessário para a liberação de produtos produzidos de forma intracelular, ocorre através de, por exemplo, rompimento químico ou enzimático e moagem em moinhos de bolas. As etapas consideradas de baixa e alta resolução consistem em métodos para se obter o bioproduto com maior pureza. No âmbito da purificação de baixa resolução podemos citar técnicas como precipitação, ultrafiltração e extração em sistemas de duas fases líquidas. Por outro lado, a purificação de alta resolução envolve técnicas mais refinadas, que oferecem maior grau de pureza, como as técnicas cromatográficas. A etapa de tratamento final consiste em operações para o acondicionamento final do produto como liofilização e secagem por *spray drying* (YENKIE; WU; MARAVELIAS, 2017).

2.3.4 Purificação de baixa resolução

Os sistemas aquosos de duas fases (ATPS) ou sistemas bifásicos aquosos (ABS) são constituídos quando dois componentes solúveis em água tais como *polímeros*, líquidos iônicos, álcoois, sais e açúcares são misturados em água, acima de uma dada concentração que leva à formação de um sistema bifásico (líquido-líquido). Esse sistema, envolve a seleção de duas soluções aquosas que são imiscíveis e possuem densidades diferentes, que depende da aplicação do ATPS. Por exemplo, se o ATPS for utilizado para purificação de proteínas, as duas soluções aquosas devem ser escolhidas de forma que a proteína de interesse seja preferencialmente particionada em uma das fases. (KHAYATI; ANVARI; SHAHIDI, 2015) indicaram em seu trabalho que a extração aquosa em duas fases é uma técnica promissora para a recuperação/purificação da β -galactosidase extracelular de *Aspergillus niger*, pois a enzima tendeu a particionar na fase superior em todos os sistemas bifásicos aquosos de diferentes concentrações de polietilenoglicol (PEG) e sulfato de amônio que foram avaliados e ainda

verificaram que a partição da β -galactosidase foi fortemente dependente do tipo e da concentração do sal.

Outra técnica utilizada para a purificação de enzimas é a ultrafiltração, que consiste em um sistema de membrana acionados por baixa pressão que separam contaminantes por exclusão de tamanho e desse modo purificam e concentram as macromoléculas (LIN; TSENG; WANG, 2021). Em seu trabalho, Fernandes et al. (2002) utilizaram ultrafiltração dentre os métodos utilizados (Sistema aquoso de duas fases, cromatografia de interação hidrofóbica e ultrafiltração) para purificar β -galactosidase de *Pseudoalteromonas sp.*, um microrganismo psicrotrófico, e concluíram que a técnica de purificação em conjunto com extração aquosa de duas fases, cromatografia de interação hidrofóbica foram úteis para o isolamento de enzimas ativas pelo frio, pois a β -galactosidase purificada apresentou atividade específica de 251 U/mg.

Ainda na purificação de baixa resolução se encontra a precipitação, que é um método simples e econômico, comum para separar e purificar proteínas. Os métodos mais usados de precipitação incluem precipitação com solvente orgânico, precipitação com sal, precipitação ácida/alcalina, precipitação por afinidade e outros métodos de precipitação. O sulfato de amônio é comumente utilizado devido a sua excelente solubilidade, baixo custo, baixa geração de calor durante a dissolução e diferenças de densidade entre soluções após a dissolução e sedimentação (FAN ET AL., 2020). Diversos pesquisadores utilizaram a precipitação com sulfato de amônio como uma etapa inicial de purificação (EL-GINDY, 2003; HUNG; LEE, 2002; ISOBÉ et al., 2013; NAGY et al., 2001; NGUYEN et al., 2006)

2.3.5 Purificação de alta resolução

A Cromatografia Multimodal ou Modo Misto (MMC) é descrita na literatura como purificação de alta resolução. Nessa técnica, acontece a combinação de dois ou mais tipos de interação intermolecular, a matriz de suporte possui ligantes que podem interagir com a enzima de diversas maneiras como interações iônicas e hidrofóbicas, isso aumenta a capacidade de ligação adsorvente-adsorbato, devido a esses fenômenos simultâneos de adsorção que ocorrem na superfície do ligante (EBERSBACH; GEISSE, 2012; LIMA et al., 2016). De acordo com Lima et al. (2016) a técnica de Cromatografia em Modo Misto é viável e eficaz na recuperação e purificação de β -galactosidases intracelular de *K. lactis*. Segundo os autores, os resultados obtidos na pesquisa se mostraram promissores e confirmam a possibilidade de isolamento da enzima para posterior imobilização ou outros fins que exijam que a enzima tenha maior grau de pureza.

Outras técnicas cromatográficas também têm sido empregadas para a purificação da β -galactosidase, como a cromatografia de troca iônica (IEX), que é amplamente utilizada em indústrias de biotecnologia para purificar proteínas. Essa técnica baseia-se na interação eletrostática entre grupos carregados da proteína e grupos funcionais de carga oposta fixados na matriz do meio cromatográfico poroso permitindo a separação com base na carga líquida das moléculas sob determinadas condições de pH e força iônica. (HARINARAYAN et al., 2006). No trabalho de Carvalho et al. (2022) os autores testaram quatro tipos de adsorventes (Multimodal Capto MMC, Streamline SP, Streamline DEAE e Amberlite XAD polimérico-XDA 7) e três pHs (6,0, 7,0 e 8,0) para a purificação de β -galactosidase intracelular de *K. lactis* por cromatografia de troca iônica. Segundo os autores foi observado que o Streamline DEAE e a Amberlite XAD polimérico-XDA 7 apresentaram melhor seletividade à molécula alvo em pH 6,0, com capacidade de retenção da enzima de $18,77 \pm 0,14$ U/g, e $20,97 \pm 0,41$ U/g, respectivamente.

No estudo de Oliveira de Medeiros; Veiga Burkert; Juliano Kalil, (2012). também foi utilizada a cromatografia de troca iônica para purificação da β -galactosidase. Para atingir a esse objetivo os autores aplicaram um planejamento experimental e metodologia de superfície de resposta na avaliação do efeito do pH de eluição e volume do gradiente para purificação de β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* por cromatografia de troca iônica. Os autores enfatizaram a importância da otimização dos parâmetros de pH de eluição e volume do gradiente com o objetivo de atingir uma alta purificação da proteína alvo (MANZANARES; DE GRAAFF; VISSER, 1998) e, para isso utilizaram cromatografia de troca iônica. A enzima purificada manteve 90% de sua atividade em pH entre 3,5 e 4,5 e se manteve estável a 30°C por 20 horas.

Outra técnica utilizada na purificação de enzimas é a cromatografia de afinidade com metal imobilizado (IMAC), uma estratégia baseada na interação entre íons metálicos e resíduos de aminoácidos presentes na superfície das proteínas. Nessa técnica, compostos quelantes são ligados covalentemente a suportes cromatográficos sólidos, permitindo a imobilização de íons metálicos (como Ni^{2+} , Co^{2+} ou Zn^{2+}), que atuam como ligantes de afinidade. A separação ocorre por meio da ligação coordenada entre esses íons e resíduos específicos, como histidina, cisteína e triptofano, presentes nas proteínas-alvo. É uma técnica utilizada quando é necessário uma purificação rápida e substancial pureza do produto (GABERC-POREKAR; MENART, 2001). Pessela et al. (2004) em seu trabalho com β -galactosidase de *Thermus sp. superexpressas* em *Escherichia coli* utilizaram Cu-quelato-agarose como suporte para a purificação da enzima por Cromatografia de afinidade com metal imobilizado (IMAC) com o objetivo de conseguir

uma purificação com suportes poucos ativados para a adsorção a fim de facilitar a dessorção das proteínas alvo. Os autores concluíram que o uso de matrizes IMAC feitas sob medida pode permitir uma purificação rápida e fácil de proteínas grandes pela sua adsorção seletiva em suportes pouco ativados.

A cromatografia de interação hidrofóbica explora a interação reversível entre a superfície hidrofóbica em uma proteína e o ligante hidrofóbico de um meio cromatográfico em concentrações relativamente altas de sal, especialmente sal anticaotrópico (também conhecido como sal cosmotrópico ou liotrópico). Este sal possui maior polaridade e ligam-se fortemente à água, induzindo a exclusão de água na superfície da proteína e do ligante, isso promove interações hidrofóbicas e precipitação de proteínas (LIENQUEO et al., 2007).

A cromatofocagem é uma técnica de purificação empregada quando a afinidade de adsorção da proteína-alvo é altamente sensível ao pH. O processo utiliza um gradiente de pH estável e controlado dentro da coluna cromatográfica, permitindo que as proteínas migrem até atingirem seu ponto isoelétrico (pI), no qual não possuem carga líquida e, portanto, deixam de interagir com a matriz da coluna. Essa técnica permite a separação de proteínas com base em pequenas diferenças de pI, sendo especialmente útil para a purificação de isoformas (NARAHARI et al., 2001). A cromatofocagem geralmente é combinada com outras técnicas cromatográficas para alcançar maior pureza e uma separação mais refinada e uma purificação mais eficiente. O'Connell; Walsh, (2010) utilizaram técnicas como a ultrafiltração, cromatografia de filtração em gel, troca iônica, cromatofocagem e interação hidrofóbica, para purificar a enzima β -galactosidase, a qual apresentou alta estabilidade quando foi exposta a condições gástricas simuladas in vitro, retendo $68 \pm 2\%$ dos níveis de atividade original.

A cromatografia de filtração em gel (também conhecida por cromatografia de exclusão por tamanho) é uma forma de cromatografia de partição usada para separar moléculas de diferentes tamanhos moleculares. É um método de separação popular devido à sua versatilidade, a ampla variedade de matrizes comercialmente disponíveis e às condições amenas de operação (Ó'FÁGÁIN; CUMMINS; O'CONNOR, 2017). No trabalho de Martarello et al. (2019) com β -galactosidase extracelular de *Aspergillus niger*, foi utilizado a cromatografia de filtração em gel como uma das técnicas do processo de purificação. Os autores encontraram condições favoráveis para aplicabilidade nas indústrias farmacêuticas e alimentícia, pois a enzima parcialmente purificada apresentou temperatura ótima de 50 °C e pH ótimo de 5,0, estável nestas condições por 15h. A enzima também foi exposta a condições próximas do pH gástrico e na presença de pepsina, e 80% da atividade foi preservada após 2 h.

Uma outra técnica de purificação que tem sido empregada com sucesso na purificação de biomoléculas é a adsorção em leito expandido. É um processo integrado que combina separação sólido-líquido, redução de volume por adsorção de proteínas e recuperação do produto em uma única operação unitária (DE ARAÚJO et al., 2016). Boeris et al. (2012) em seu trabalho objetivou melhorar a aplicação da adsorção em leito expandido para recuperação da β -galactosidase extracelular de *Saccharomyces cerevisiae*, cobrindo a matriz com polivinil pirrolidona (PVP), isso evitou o entupimento, a formação do canal e a estabilidade do leito foram significativamente melhoradas, assim aumentando a pureza da enzima.

Os processos de secagem são considerados adequados para obtenção de pós enzimáticos estáveis purificados, e os principais métodos utilizados são o *spray drying* e a liofilização. Os produtos secos apresentam muitas vantagens, em especial a estabilidade e facilidade no armazenamento. O processo de secagem por liofilização geralmente é recomendado para secagem de materiais sensíveis ao calor e de alto valor, como proteínas, pois nesse processo a solução ou suspensão é congelada e o solvente é removido por sublimação sob vácuo (MOHTAR et al., 2019). Na secagem por *spray drying* o líquido de alimentação é transformado em um pó seco através da evaporação do solvente durante a atomização (GUPTA et al., 2014).

Na Tabela 2.2 são apresentados estudos de diversos métodos de purificação enzimática, e os resultados provenientes da purificação.

Tabela 2.2- Recuperação e purificação da enzima β -galactosidase através de diversos métodos.

Fonte	Método de purificação	Características da enzima purificada	Referência
<i>Aspergillus niger</i>	Sistemas bifásicos aquosos (ATPS)	A enzima apresentou fator de purificação de 38,17 vezes, com um ATPS compreendendo 15,24% (p/p) de polietilenoglicol (PEG) 2000 e 17,14% (p/p) de sulfato de amônio $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ em pH 7.	(KHAYATI; ANVARI; SHAHIDI, 2015)
<i>Kluyveromyces lactis</i>	Centrifugação, precipitação sulfato de amônio, diálise e cromatografia de modo misto.	A enzima purificada apresentou atividade enzimática de 540 U/mg, fator de purificação 3,4 vezes e recuperação de 48%.	(LIMA et al., 2016)
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Ultrassom e esferas de vidro, cromatografia de troca iônica.	Apresentou-se uma enzima com fator de purificação de 12 vezes e recuperação de 85,5% em uma única etapa cromatográfica.	(MEDEIROS; VEIGA BURKERT; JULIANO KALIL, 2012)

<i>Thermus sp.</i> <i>Superexpressas</i> <i>em Escherichia coli</i>	Cromatografia de afinidade de íons metálicos imobilizados.	Foi utilizado Cu-quelato-agarose como suporte. A adsorção com apenas 0,25 µmol/g de Cu-quelato-agarose, adsorveu 65% da atividade da β-galactosidase após 24 horas. Para 15 µmol/g de suporte, a adsorção foi de 90%, demonstrando uma seletividade muito menor em relação à proteína alvo. Quando foi utilizado suporte pouco ativado para a adsorção da enzima, sua liberação foi com muita facilidade (utilizando apenas imidazol 3 mM), e ao utilizar suportes com maior grau de ativação, a dessorção tornou-se mais difícil.
<i>Aspergillus niger</i>	Filtração, cromatografia de troca iônica e eluição com NaCl.	Os autores apresentaram um rendimento final da purificação de 21%, com fator de purificação de 159 vezes, e atividade enzimática total de 31,5 U. (MANZANARES ; DE GRAAFF; VISSER, 1998)
<i>Pseudoalteromonas sp</i>	Sistema aquoso de duas fases, cromatografia de interação hidrofóbica e ultrafiltração.	Os resultados encontrados foram atividade específica de 251 U/mg, rendimento de 62% e fator de purificação de 392. A enzima apresentou pH ótimo de 9 e temperatura ótima de 26°C. (FERNANDES et al., 2002)

<i>Penicillium chrysogenum</i>	Precipitação com sulfato de amônio, cromatografia de troca iônica e afinidade cromatofocagem.	Essas etapas resultaram em um fator de purificação de 66 vezes, um rendimento de cerca de 8% e uma atividade específica de 5,84 U mg ⁻¹ , pH ótimo de 4-5 e temperatura ótima de 30°C.	(NAGY et al., 2001)
<i>Aspergillus carbonarius</i>	Precipitação com sulfato de amônio, cromatografia de filtração em gel e troca iônica.	Rendimento de 45,3%, fator de purificação de 52,9 vezes, atividade específica de 4588 µkat/g.	(EL-GINDY, 2003)
<i>Aspergillus niger</i>	Ultrafiltração, cromatografia de gel, filtração e cromatografia de troca iônica.	Atividade específica de 1502,0 UI/mg, rendimento de 17,331% e um fator purificação de 8,665. A atividade enzimática manteve-se constante na faixa de temperatura de 20°C a 60°C e pH ótimo de 3.	(MARTARELLO et al., 2019)
<i>Aspergillus carbonarius</i>	Ultrafiltração, cromatografias de gel filtração, troca iônica e hidrofobicidade.	Apresentaram fator de purificação 6 e 3 vezes, rendimento de 5% e 1%, atividade específica de 11,16 e 5,54 (U/mg).	(O'CONNELL; WALSH, 2008)
<i>Aspergillus niger</i>	Ultrafiltração, cromatografia de filtração em gel, troca iônica, cromatofocagem e interação hidrofóbica.	Alcançaram atividade específica de 69,3 U/ml, rendimento de 10%, fator de purificação de 53,3, apresentou pH ótimo de 2,0 e 4,0 e temperatura ótima de 65°C.	(O'CONNELL; WALSH, 2010)

<i>Teratosphaeria acidotherma</i>	Precipitação com sulfato de amônia, cromatografia de troca iônica, hidrofobicidade e cromatografia de filtração em gel.	Apresentaram um fator de purificação de 375 vezes, recuperação de 2,9%, atividade específica 5,48 U/mg, pH ótimo entre 2,5 e 4, e máxima atividade a 70°C.	(ISOBE et al., 2013)
<i>Lactobacillus reuteri</i> (Cepa A: L103; cepa B: L461)	Precipitação de sulfato de amônio, Cromatografia de Interação Hidrofóbica, Cromatografia de afinidade.	A cepa A apresentou atividade específica de 158 U/mg, fator de purificação de 16,5 e recuperação de 7%, pH ótimo para hidrólise de 8 e temperatura ótima de 50°C. Já a cepa B apresentou atividade específica de 180 U/mg, fator de purificação 54 e recuperação de 12%, pH ótimo de 6,5 e temperatura ótima de 50°C.	(NGUYEN et al., 2006)
<i>Bacillus licheniformis</i> clonada de <i>Escherichia coli</i>	Cromatografia de afinidade.	Atividade específica de 270 U/mg, fator de purificação de 5,3, e recuperação de 73%. A enzima foi estável a pH 5 e 9 a 37°C e até 42°C a pH 6,5 por até 1 mês.	(JUAJUN et al., 2011)
<i>Bacillus licheniformis</i> clonada de <i>Escherichia coli</i>	Precipitação com sulfato de amônio, cromatografia de troca aniônica e cromatografia de filtração em gel.	Atividade específica de 125,2 U/mg, rendimento de 19,7%, fator de purificação de 19,4. A enzima apresentou pH ótimo de 7,0 e reteve mais de 80% de sua atividade na faixa de pH de 6,0 a 7,5 e temperatura ótima de 70° C, apresentando termoeestabilidade.	(CHEN et al., 2008)

<i>Bifidobacterium longum</i>	Ultrassom, centrifugação, cromatografia de troca iônica e cromatografia de filtração em gel.	Atividade específica de 168,6 U/mg, purificação de 15,7 vezes, um rendimento de 29,3% e obtiveram pH e a temperatura ótimos de 7,0 e 50°C, respectivamente.	(HSU; YU; CHOU, 2006)
<i>Bifidobacterium infantis expressa em E.coli</i>	Precipitação de sulfato de amônio, cromatografia de troca iônica e de filtração em gel.	Atividade específica de 568,7 U/mg, fator de purificação 15,5 vezes e fator de recuperação de 46%, com temperatura ótima para 61 hidrólise da lactose de 50°C e pH ótimo de 7,5.	(HUNG; LEE, 2002)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Centrifugação, moinho de esferas, adsorção em leito expandido usando Streamline-DEAE coberto com polivinilpirrolidona 360 (PVP).	Recuperação de 65%, aumentando 12,6 vezes, atividade específica 1166 AU/mg.	(BOERIS et al., 2012)
<i>Aspergillus oryzae (cepa mutante)</i>	Cromatografia de Afinidade de íons metálicos (IMAC) e de filtração em gel.	Atividade específica de 191,6 U/mg, fator de purificação 15,3 vezes e rendimento de 60%. A enzima mutante apresentou ser termotolerante, preservando 88% da sua atividade pós incubação durante 2 h a 60°C.	(TODOROVA-BALVAY et al., 2006)

<i>Kluyveromyces lactis</i>	Cromatografia de troca iônica em coluna de leito fixo.	A fração de β -galactose eluída com 0,1-0,4 M de NaCl apresentou rendimento de $51,65 \pm 0,17\%$ e fator de purificação de $2,00 \pm 0,43$.	(DE CARVALHO et al., 2022)
<i>Escherichia coli</i>	Secagem por <i>spray drying</i> .	Foi utilizado quitosana, goma arábica, quitosana modificada, alginato de cálcio e alginato de sódio, como agentes carreadores para a secagem. A atividade enzimática apresentada para a enzima com quitosana, goma arábica, quitosana modificada, alginato de cálcio e alginato de sódio foi de 20%, 37%, 20% e 13% respectivamente. Os valores da constante de Michaelis-Menten (Km) foram $0,52\text{mM} \pm 0,18$ para a enzima com goma arábica, $0,77\text{mM} \pm 0,34$ para alginato de cálcio, $0,44\text{mM} \pm 0,11$ para alginato de sódio, $0,13\text{mM} \pm 0,03$ para quitosana modificada, já os valores de Velocidade máxima ($V_{\text{máx}}$) (micromoles de O-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo (ONPG) hidrolisado/min) foram $0,58 \pm 0,30$ 0,99 para goma arábica, $0,29 \pm 0,13$ para alginato de cálcio, $0,11 \pm 0,04$ para alginato de sódio, $0,11 \pm 0,04$ para quitosana modificada.	(ESTEVINHO et al., 2014)
<i>Escherichia coli</i>	Secagem por <i>spray drying</i> .	Foram preparadas 5 soluções de enzima com quitosana modificada como agente carreador em diferentes pH. O maior valor de K_{max} ($0,32\text{ }\mu\text{mol de ONPG hidrolisado min}^{-1}$) foi encontrado em pH 6 com km de $0,67\text{ mmol L}^{-1}$). A enzima manteve 55% da atividade em relação a enzima livre em pH 6.	(ESTEVINHO; RAMOS; ROCHA, 2015)

<i>Aspergillus oryzae</i>	Filtração de fluxo tangencial, liofilização.	A β -galactosidase foi liofilizada com trealose, sacarose, celobiose e melibiose. Após 90 dias de armazenamento a 45°C, todos os liofilizados contendo proteína permaneceram amorfos. A atividade residual da enzima foi de quase 100% para a enzima liofilizada na presença dos excipientes, já a enzima liofilizada sem o uso de excipiente foi de aproximadamente 13%.
-------------------------------	---	---

Os métodos de purificação mais observados na literatura foram precipitação com sulfato de amônio, cromatografia de troca iônica, cromatografia de interação hidrofóbica, cromatografia de filtração em gel, ultrafiltração e secagem por *spray drying*. As técnicas de precipitação e ultrafiltração são comumente utilizadas como métodos de purificação intermediária sendo muitas vezes utilizando uma cromatografia para obter uma maior pureza. Carvalho et al. (2022) concluíram em sua pesquisa que a cromatografia de troca iônica de estágio único é uma excelente estratégia de recuperação de β -galactosidase de *K. lactis* com potenciais aplicações industriais.

No entanto a técnica de purificação por sistemas aquosos de duas fases (ATPS) é uma estratégia interessante, principalmente devido à retenção da atividade catalítica, alta biocompatibilidade, manutenção da estabilidade devido a condições não desnaturantes, baixo consumo de energia, menores cargas ambientais e relativa confiabilidade no aumento de escala. Além disso, esse método proporciona um tempo de processamento menor já que estes processos de isolamento de passo único permitem a purificação simultânea de moléculas alvo e a remoção de contaminante (NADAR; PAWAR; RATHOD, 2017). Já a técnica de cromatografia de afinidade apesar de ser altamente vantajosa em termos da sua seletividade e simplicidade do processo em comparação com os demais métodos, é dispendiosa devido ao uso de matrizes de cromatografia caras (KATO et al., 2023).

Como pode ser observado pelos dados apresentados na Tabela 2.2, processos de secagem de enzimas também têm sido utilizados como parte do processo, podendo necessitar de outros métodos mais sofisticados para aumentar o grau de pureza. A secagem por *spray drying*, no entanto, é considerada uma alternativa mais adequada para produções de larga escala, pois seu custo é muito inferior ao da liofilização, além de ser um processo mais rápido e eficiente (SATO et al., 2014; SURESH et al., 2019). A secagem por *spray drying* tem se mostrado mais vantajosa pois nesse caso, é comum que o próprio estresse do processo deixe a célula porosa ou faça o rompimento tornando as enzimas mais acessíveis, e de certa forma a célula protege a enzima durante a secagem, assim obtém-se o biocatalizador seco. Essa situação acontece quando o caldo fermentado é submetido diretamente a secagem, no caso de adicionar algum coadjuvante (ou agente carreador) na solução, pode-se formar microcápsulas em torno das células, e nesse caso tem-se um processo de microencapsulação. Alguns estudos também utilizam os agentes carreadores em soluções com a enzima, e nesse caso a microcápsula é formada em torno do biocatalizador.

A escolha da tecnologia do processo produtivo e do grau de purificação de uma enzima depende de alguns fatores dentre eles: a fonte microbiana, a natureza do substrato, as características físico-químicas da enzima, a viabilidade econômica da produção e a finalidade de aplicação da enzima. Outro ponto importante de se considerar é a faixa de pH na qual a enzima apresenta maior atividade. Por exemplo, β -galactosidases com pH ótimo ácido, normalmente produzidas por fungos, são mais adequadas para processamento de permeado de soro de leite e soro de leite ácido. Por outro lado, as enzimas com pH neutro, geralmente produzidas por leveduras e bactérias, são mais indicadas para o processamento de leite e soro de leite doce (PANESAR et al., 2006).

2.4 CONCLUSÃO

A utilização de β -galactosidase na indústria alimentícia se torna cada dia mais importante, assim indivíduos que são intolerantes à lactose podem manter o consumo de produtos lácteos que são benéficos para uma boa nutrição. Além disso, através da atividade de transglicosilação da β -galactosidase pode-se obter um prebiótico excelente para a manutenção da saúde, que são os galactoligossacarídeos. No entanto, para a sua aplicação nas indústrias de alimentos as β -galactosidasas de fontes microbianas seguras devem passar por etapas de recuperação e purificação após a fermentação. Nesse contexto, a retenção da atividade catalítica das enzimas é importante para o sucesso dos processos de extração, assim como redução de etapas do processo, economizando tempo e custos operacionais.

A presente revisão evidenciou a preocupação dos pesquisadores em aprimorar a otimização dos processos de purificação, com foco na manutenção da atividade enzimática da β -galactosidase e na redução dos custos operacionais. O método de secagem por atomização tem se destacado como uma abordagem promissora para a recuperação da β -galactosidase, porém, apesar do seu potencial de estabilização da β -galactosidase, a secagem por *spray drying* pode não ser suficiente para garantir a purificação completa da enzima, sendo necessário associar a outros métodos, a fim de remover impurezas e aumentar a eficiência do processo.

2.5 REFERÊNCIAS

BALASUNDARAM, B.; PANDIT, A. B. Significance of Location of Enzymes on Their Release During Microbial Cell Disruption. **Biotechnology and bioengineering**, v. 75, n. 5, 2001. <https://doi.org/10.1002/bit.10072>.

BANO, Saeeda *et al.* Purification and characterization of β -galactosidase from *Aspergillus fumigatus* PCSIR-2013. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 34, n. 4, p. 1333–1340, 1 jul. 2021.

BELLAOUCHI, Reda *et al.* Characterization and optimization of extracellular enzymes production by *Aspergillus niger* strains isolated from date by-products. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 19, n. 1, 1 dez. 2021. <https://doi.org/10.1186/s43141-021-00145-y>.

BOERIS, Valeria *et al.* Production, recovery and purification of a recombinant β -galactosidase by expanded bed anion exchange adsorption. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 900, p. 32–37, 1 jul. 2012. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2012.05.024>.

CHEN, W. *et al.* Production, purification, and characterization of a potential thermostable galactosidase for milk lactose hydrolysis from *Bacillus stearothermophilus*. **Journal of Dairy Science**, v. 91, n. 5, p. 1751–1758, 2008. <https://doi.org/10.3168/jds.2007-617>.

CHOONIA, Huzaiifa S.; LELE, S. S. Kinetic modeling and implementation of superior process strategies for β -galactosidase production during submerged fermentation in a stirred tank bioreactor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 77, p. 49–57, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2013.04.021>.

DE ARAÚJO, Nathália Kelly *et al.* Recovery and purification of chitosanase produced by *Bacillus cereus* using expanded bed adsorption and central composite design. **Journal of Separation Science**, v. 39, n. 4, p. 709–716, 1 fev. 2016. <https://doi.org/10.1002/jssc.201500900>.

DE CARVALHO, Catherine T. *et al.* Recovery of β -galactosidase produced by *Kluyveromyces lactis* by ion-exchange chromatography: Influence of pH and ionic strength parameters. **Anais da Academia Brasileira de Ciencias**, v. 94, n. 1, 2022. <https://doi.org/10.1590/0001-3765202220200752>.

DE JESUS, L. F. M. C.; GUIMARÃES, L. H. S. Production of β -galactosidase by *Trichoderma* sp. through solid-state fermentation targeting the recovery of galactooligosaccharides from whey cheese. **Journal of Applied Microbiology**, v. 130, n. 3, p. 865–877, 1 mar. 2021. <https://doi.org/10.1111/jam.14805>.

DE JESUS, S. S.; MACIEL FILHO, R. Drying of α -amylase by spray drying and freeze-drying - A comparative study. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 31, n. 3, p. 625–631, 1 jul. 2014. <https://doi.org/10.1590/0104-6632.20140313s00002642>.

DE LEÓN-RODRÍGUEZ, Antonio *et al.* Production of penicillin acylase by a recombinant *Escherichia coli* using cheese whey as substrate and inducer. **Biomolecular Engineering**, v. 23, n. 6, p. 299–305, dez. 2006. <https://doi.org/10.1016/j.bioeng.2006.09.003>.

DE SOUSA, Carla Cristina *et al.* Synthesis and Immobilization of β -galactosidase from *Kluyveromyces marxianus* Using Ion Exchange Resin. **Industrial Biotechnology**, v. 17, n. 1, p. 27–37, 1 fev. 2021. <https://doi.org/10.1089/ind.2020.0007>.

DEKKER, Peter; KOENDERS, Damiet; BRUINS, Maaïke. Lactose-Free Dairy Products: Market Developments, Production, Nutrition and Health Benefits. **Nutrients**, v. 11, n. 3, p. 551, 5 mar. 2019. <https://doi.org/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**, v. 22, n. 4, p. 377–395, jun. 2005. <https://doi.org/10.1080/02652040500100139>.

DESCAMPS, Nicolas *et al.* Glass transition and flowability/caking behaviour of maltodextrin de 21. **Journal of Food Engineering**, v. 119, n. 4, p. 809–813, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.06.045>.

DÍAZ VERGARA, Ladislao I. *et al.* Chitosan-glucose derivative as effective wall material for probiotic yeasts microencapsulation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 253, 31 dez. 2023. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.127167>.

DOMINGUES, Lucília *et al.* Production of β -galactosidase from recombinant *Saccharomyces cerevisiae* grown on lactose. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 79, n. 8, p. 809–815, ago. 2004. <https://doi.org/10.1002/jctb.1025>.

DUTRA ROSOLEN, Michele *et al.* Lactose Hydrolysis in Milk and Dairy Whey Using Microbial β -Galactosidases. **Enzyme Research**, v. 2015, p. 1–7, 26 out. 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/806240>.

EBERSBACH, Hilmar; GEISSE, Sabine. Antigen generation and display in therapeutic antibody drug discovery - a neglected but critical player. **Biotechnology Journal**, v. 7, n. 12, p. 1433–1443, dez. 2012. <https://doi.org/10.1002/biot.201200066>.

EL-GINDY, A. Production, Partial Purification and Some Properties of β -Galactosidase from *Aspergillus carbonarius*. **Folia Microbiol**, v. 48, n. 5, p. 581–584, 2003. <https://doi.org/10.1002/biot.201200066>.

ESTEVINHO, Berta N. *et al.* Microencapsulation of β -galactosidase with different biopolymers by a spray-drying process. **Food Research International**, v. 64, p. 134–140, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.05.057>

ESTEVINHO, Berta N.; RAMOS, Irena; ROCHA, Fernando. Effect of the pH in the formation of β -galactosidase microparticles produced by a spray-drying process. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 78, p. 238–242, 1 jul. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.03.049>.

FAN, Xiying *et al.* Integrated purification of a nanobody using ammonium sulfate precipitation and Capto MMC. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 95, n. 1, p. 246–254, 1 jan. 2020. <https://doi.org/10.1002/jctb.6228>.

FARKADE, Vivek D.; HARRISON, Sue; PANDIT, Aniruddha B. Heat induced translocation of proteins and enzymes within the cell: An effective way to optimize the microbial cell disruption process. **Biochemical Engineering Journal**, v. 23, n. 3, p. 247–257, 1 maio 2005. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2005.01.001>.

FASIM, Aneesa; MORE, Veena S.; MORE, Sunil S. Large-scale production of enzymes for biotechnology uses. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 69, p. 68–76, 1 jun. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2020.12.002>.

FERNANDES, S. *et al.* β -Galactosidase from a cold-adapted bacterium: Purification, characterization and application for lactose hydrolysis. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 58, n. 3, p. 313–321, 2002. <https://doi.org/10.1007/s00253-001-0905-4>.

FERREIRA ROSA, Paula R bia; SANTOS, Samantha Christine; SILVA, Edson Luiz. Different ratios of carbon sources in the fermentation of cheese whey and glucose as substrates for hydrogen and ethanol production in continuous reactors. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 39, n. 3, p. 1288–1296, 16 jan. 2014. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2013.11.011>

GABARDO, Sabrina *et al.* Dynamics of ethanol production from whey and whey permeate by immobilized strains of *Kluyveromyces marxianus* in batch and continuous bioreactors. **Renewable Energy**, v. 69, p. 89–96, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2014.03.023>.

GABERC-POREKAR, Vladka; MENART, Viktor. Perspectives of immobilized-metal affinity chromatography. **J. Biochem. Biophys. Methods**, v. 49, p. 335–360, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0165-022X\(01\)00207-X](https://doi.org/10.1016/S0165-022X(01)00207-X).

GENNARI, Adriano *et al.* Recombinant production in *Escherichia coli* of a β -galactosidase fused to a cellulose-binding domain using low-cost inducers in fed-batch cultivation. **Process Biochemistry**, v. 124, p. 290–298, 1 jan. 2023. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2022.11.024>.

GHANDI, Amir *et al.* The Effect of Dryer Inlet and Outlet Air Temperatures and Protectant Solids on the Survival of *Lactococcus lactis* during Spray Drying. **Drying Technology**, v. 30, n. 14, p. 1649–1657, nov. 2012. <https://doi.org/10.1080/07373937.2012.703743>.

GUPTA, Gupteshwar *et al.* Spray-drying of xylanase from thermophilic fungus *Melanocarpus albomyces*-Effect of carriers and binders on enzyme stability. **Indian Journal of Chemical Technology**, v. 21, p. 89–95, 2014.

HARINARAYAN, C. *et al.* An exclusion mechanism in ion exchange chromatography. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 95, n. 5, p. 775–787, 5 dez. 2006. <https://doi.org/10.1002/bit.21080>.

HELJO, Ville Petteri *et al.* The use of disaccharides in inhibiting enzymatic activity loss and secondary structure changes in freeze-dried β -galactosidase during storage. **Pharmaceutical Research**, v. 28, n. 3, p. 540–552, mar. 2011. <https://doi.org/10.1007/s11095-010-0300-x>.

HSU, Chin An; YU, Roch Chui; CHOU, Cheng Chun. Purification and characterization of a sodium-stimulated β -galactosidase from *Bifidobacterium longum* CCRC 15708. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, n. 4, p. 355–361, abr. 2006. <https://doi.org/10.1007/s11274-005-9041-0>.

HUNG, M. N.; LEE, B. Purification and characterization of a recombinant β -galactosidase with transgalactosylation activity from *Bifidobacterium infantis* HL96. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 58, n. 4, p. 439–445, 2002. <https://doi.org/10.1007/s00253-001-0911-6>

ISOBE, Kimiyasu *et al.* Characterization of new β -galactosidase from acidophilic fungus, *Teratosphaeria acidotherma* AIU BGA-1. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 116, n. 3, p. 293–297, set. 2013. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2013.03.012>.

JUAJUN, Onladda *et al.* Cloning, purification, and characterization of β -galactosidase from *Bacillus licheniformis* DSM 13. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 89, n. 3, p. 645–654, fev. 2011. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2862-2>.

KATO, Shunsuke *et al.* Chitin- and Streptavidin-Mediated Affinity Purification Systems: A Screening Platform for Enzyme Discovery. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 62, n. 31, 1 ago. 2023. <https://doi.org/10.1002/anie.202303764>.

KAUR, Rupinder; PANWAR, Divyani; PANESAR, Parmjit S. Biotechnological approach for valorization of whey for value-added products. **Food Industry Wastes: Assessment and Recuperation of Commodities**, p. 275–302, 1 jan. 2020. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817121-9.00013-9>.

KHAYATI, Gholam; ANVARI, Masumeh; SHAHIDI, Nushin. Partitioning of β -galactosidase in aqueous two-phase systems containing polyethyleneglycol and phosphate salts. **Fluid Phase Equilibria**, v. 385, p. 147–152, 5 jan. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.fluid.2014.11.003>.

LAKSHMI, B. K. M.; MUNI KUMAR, D.; HEMALATHA, K. P. J. Purification and characterization of alkaline protease with novel properties from *Bacillus cereus* strain S8. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 16, n. 2, p. 295–304, 1 dez. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2018.05.009>.

LEMES, Ailton C. *et al.* Design strategies for integrated β -galactosidase purification processes. **Chemical Engineering and Technology**, v. 37, n. 10, p. 1805–1812, 1 out. 2014. <https://doi.org/10.1002/ceat.201300433>.

LIENQUEO, M. Elena *et al.* Current insights on protein behaviour in hydrophobic interaction chromatography. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the**

Biomedical and Life Sciences, v. 849, n. 1–2, p. 53–68, 15 abr. 2007. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2006.11.019>.

LIMA, Micael de Andrade *et al.* Recovery and purification of a *Kluyvermyces lactis* β -galactosidase by Mixed Mode Chromatography. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 1015–1016, p. 181–191, 15 mar. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.01.053>.

LIN, Yi Chen; TSENG, Hui Hsin; WANG, David K. Uncovering the effects of PEG porogen molecular weight and concentration on ultrafiltration membrane properties and protein purification performance. **Journal of Membrane Science**, v. 618, 15 jan. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2020.118729>.

LIPIÄINEN, Tiina *et al.* Comparison of melibiose and trehalose as stabilising excipients for spray-dried β -galactosidase formulations. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 543, n. 1–2, p. 21–28, 30 maio 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.03.035>.

LOPES, Ana R. *et al.* Production of microparticles of molinate degrading biocatalysts using the spray drying technique. **Chemosphere**, v. 161, p. 61–68, 1 out. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.07.006>.

MAJORE, Kristine; CIPROVICA, Inga. Sensory Assessment of Bi-Enzymatic-Treated Glucose-Galactose Syrup. **Fermentation**, v. 9, n. 2, 1 fev. 2023. <https://doi.org/10.3390/fermentation9020136>.

MANO, Mario Cezar Rodrigues; PAULINO, Bruno Nicolau; PASTORE, Gláucia Maria. Whey permeate as the raw material in galacto-oligosaccharide synthesis using commercial enzymes. **Food Research International**, v. 124, p. 78–85, 1 out. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.09.019>.

MANZANARES, Paloma; DE GRAAFF, Leo H.; VISSER, Jaap. Characterization of galactosidases from *Aspergillus niger*: purification of a novel-galactosidase activity. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 22, p. 383–390, 1998. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(97\)00207-X](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(97)00207-X).

MARTARELLO, Raquel Dall'Agnol *et al.* Optimization and partial purification of beta-galactosidase production by *Aspergillus niger* isolated from Brazilian soils using soybean residue. **AMB Express**, v. 9, n. 1, 1 dez. 2019. <https://doi.org/10.1186/s13568-019-0805-6>.

MARTINS, E. *et al.* Determination of ideal water activity and powder temperature after spray drying to reduce *Lactococcus lactis* cell viability loss. **Journal of Dairy Science**, v. 102, n. 7, p. 6013–6022, 1 jul. 2019. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-16297>.

MEGHWANSHI, Gautam Kumar *et al.* Enzymes for pharmaceutical and therapeutic applications. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 67, n. 4, p. 586–601, 1 jul. 2020. <https://doi.org/10.1002/bab.1919>.

MOEJES, S. N. *et al.* Closed-loop spray drying solutions for energy efficient powder production. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 47, p. 24–37, 1 jun. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2018.01.005>.

MOHTAR, Nur Syazwani *et al.* Spray-dried immobilized lipase from *Geobacillus* sp. strain ARM in sago. **PeerJ**, v. 2019, n. 5, 2019. <https://doi.org/10.7717/peerj.6880>.

MUKUNDAN, Soumya *et al.* Enhancement in β -galactosidase activity of *Streptococcus lactis* cells by entrapping in microcapsules comprising of correlated silica nanoparticles. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 195, 1 nov. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2020.111245>.

NADAR, Shamraja S.; PAWAR, Rohini G.; RATHOD, Virendra K. Recent advances in enzyme extraction strategies: A comprehensive review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 101, p. 931–957, 1 ago. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.03.055>.

NAGY, Zoltán *et al.* β -galactosidase of *Penicillium chrysogenum*: Production, purification, and characterization of the enzyme. **Protein Expression and Purification**, v. 21, n. 1, p. 24–29, 2001. <https://doi.org/10.1006/prep.2000.1344>.

NARAHARI, C. R. *et al.* Purification of recombinant green fluorescent protein using chromatofocusing with a pH gradient composed of multiple stepwise fronts. **Biotechnology Progress**, v. 17, n. 1, p. 150–160, 1 jan. 2001. <https://doi.org/10.1021/bp0001415>.

NEWTON, Matilda S. *et al.* Enzyme evolution: innovation is easy, optimization is complicated. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 48, p. 110–116, 1 fev. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2017.11.007>.

NGUYEN, Thu Ha *et al.* Purification and characterization of two novel β -galactosidases from *Lactobacillus reuteri*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 14, p. 4989–4998, 12 jul. 2006.

NGUYEN, Vuong D. *et al.* Immobilization of β -galactosidase on chitosan-coated magnetic nanoparticles and its application for synthesis of lactulose-based galactooligosaccharides. **Process Biochemistry**, v. 84, p. 30–38, 1 set. 2019. <https://doi.org/10.1021/jf053126u>.

NUMANOĞLU, Yasemin; SUNGUR, Sibel. β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* cell disruption and enzyme immobilization using a cellulose-gelatin carrier system. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 6, p. 705–711, 25 fev. 2004. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(03\)00183-3](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(03)00183-3).

O'CONNELL, S.; WALSH, G. Application relevant studies of fungal β -galactosidases with potential application in the alleviation of lactose intolerance. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 149, n. 2, p. 129–138, maio 2008. <https://doi.org/10.1007/s12010-007-8098-7>.

O'CONNELL, Shane; WALSH, Gary. A novel acid-stable, acid-active β -galactosidase potentially suited to the alleviation of lactose intolerance. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 86, n. 2, p. 517–524, mar. 2010. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2270-7>.

O'DONOGHUE, Laura T.; MURPHY, Eoin G. Nondairy food applications of whey and milk permeates: Direct and indirect uses. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 22, n. 4, p. 2652–2677, 1 jul. 2023. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.13157>.

Ó'FÁGÁIN, Ciarán; CUMMINS, Philip M.; O'CONNOR, Brendan. Gel-filtration chromatography. *In: Methods in Molecular Biology*. [S.l.]: Humana Press Inc., 2017. v. 1485 p. 15–25. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6412-3_2.

OLIVEIRA, Luiza Scalcon de *et al.* The use of probiotics and prebiotics can enable the ingestion of dairy products by lactose intolerant individuals. **Clinical Nutrition**, v. 41, n. 12, p. 2644–2650, dez. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2022.10.003>.

OLIVEIRA DE MEDEIROS, F.; VEIGA BURKERT, C. A.; JULIANO KALIL, S. Purification of β -Galactosidase by Ion Exchange Chromatography: Elution Optimization Using an Experimental Design. **Chemical Engineering and Technology**, v. 35, n. 5, p. 911–918, maio 2012. <https://doi.org/10.1002/ceat.201100571>.

PANESAR, Parmjit S. *et al.* Microbial production, immobilization and applications of β -D-galactosidase. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 81, n. 4, p. 530–543, abr. 2006. <https://doi.org/10.1002/jctb.1453>.

PANESAR, Parmjit S. *et al.* Bioutilisation of whey for lactic acid production. **Food Chemistry**, v. 105, n. 1, p. 1–14, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.03.035>.

PARASHAR, Archana *et al.* Incorporation of whey permeate, a dairy effluent, in ethanol fermentation to provide a zero waste solution for the dairy industry. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 3, p. 1859–1867, 1 mar. 2016. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10059>.

PEREIRA, Jorge F. B.; FREIRE, Mara G.; COUTINHO, João A. P. Aqueous two-phase systems: Towards novel and more disruptive applications. **Fluid Phase Equilibria**, v. 505, 1 fev. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.fluid.2019.112341>.

PIÑÓN-BALDERRAMA, Claudia I. *et al.* Encapsulation of active ingredients in food industry by spray-drying and nano spray-drying technologies. **Processes**, v. 8, n. 8, 1 ago. 2020. <https://doi.org/10.3390/pr8080889>.

RIBEIRO, Adrielle Aparecida Paulista *et al.* An Approach for Using Non-purified β -Galactosidase: The Potential of β -Galactosidase in *Kluyveromyces marxianus* Cell Microparticles with Different Wall Materials. **Food and Bioprocess Technology**, 2024. <https://doi.org/10.1007/s11947-024-03427-8>.

RISNER, Derrick *et al.* The potential production of the bioactive compound pinene using whey permeate. **Processes**, v. 8, n. 3, 1 mar. 2020. <https://doi.org/10.3390/pr8030263>.

SAMANTHA, Serra Costa *et al.* Drying by spray drying in the food industry: Micro-encapsulation, process parameters and main carriers used. **African Journal of Food Science**, v. 9, n. 9, p. 462–470, 30 set. 2015. <https://doi.org/10.5897/AJFS2015.1279>.

SAQIB, Shaima *et al.* Sources of β -galactosidase and its applications in food industry. **3 Biotech**, v. 7, n. 1, 1 maio 2017. <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0645-5>.

SATO, Vanessa Sayuri *et al.* Phytase Production by *Rhizopus microsporus* var. *microsporus* Biofilm: Characterization of Enzymatic Activity After Spray Drying in Presence of Carbohydrates and Nonconventional Adjuvants. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, n. 2, p. 177–187, 28 fev. 2014. <https://doi.org/10.4014/jmb.1308.08087>.

SHI, Xin *et al.* Engineering the optimum pH of β -galactosidase from *Aspergillus oryzae* for efficient hydrolysis of lactose. **Journal of Dairy Science**, v. 105, n. 6, p. 4772–4782, 1 jun. 2022. <https://doi.org/10.3168/jds.2021-21760>.

SIEMONS, I. *et al.* Dextrose equivalence of maltodextrins determines particle morphology development during single sessile droplet drying. **Food Research International**, v. 131, 1 maio 2020. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.108988>.

SINGH, Rahul Vikram; SAMBYAL, Krishika. β -galactosidase as an industrial enzyme: production and potential. **Chemical Papers**, v. 77, n. 1, p. 11–31, 1 jan. 2023. <https://doi.org/10.1007/s11696-022-02507-3>.

SURESH, Gayatri *et al.* Production and in-vitro evaluation of an enzyme formulation as a potential alternative to feed antibiotics in poultry. **Process Biochemistry**, v. 80, p. 9–16, 1 maio 2019. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.01.023>.

SZILAGYI, Andrew; ISHAYEK, Norma. Lactose Intolerance, Dairy Avoidance, and Treatment Options. **Nutrients**, v. 10, n. 12, p. 1994, 15 dez. 2018. <https://doi.org/10.3390/nu10121994>

SZUDERA-KONCZAL, Kamila *et al.* The Use of Sour and Sweet Whey in Producing Compositions with Pleasant Aromas Using the Mold *Galactomyces geotrichum*: Identification of key odorants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 68, n. 39, p. 10799–10807, 30 set. 2020. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c03979>.

TODOROVA-BALVAY, Daniela *et al.* An efficient two step purification and molecular characterization of β -galactosidases from *Aspergillus oryzae*. **Journal of Molecular Recognition**, v. 19, n. 4, p. 299–304, jul. 2006. <https://doi.org/10.1002/jmr.788>.

WILKOWSKA, Agnieszka *et al.* Growth and by-product profiles of *Kluyveromyces marxianus* cells immobilized in foamed alginate. **Yeast**, v. 32, n. 1, p. 217–225, 1 jan. 2015. <https://doi.org/10.1002/yea.3044>.

WILSON, Lorena *et al.* Co-immobilized carrier-free enzymes for lactose upgrading. **Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry**, v. 33, 1 fev. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.cogsc.2021.100553>.

WITTEWER, Anna Elizabeth; LEE, Simon Gardner; RANADHEERA, Chaminda Senaka. Potential associations between organic dairy products, gut microbiome, and gut health: A review. **Food Research International**, v. 172, p. 113195, out. 2023. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2023.113195>.

WU, Yuanbing *et al.* Chitosan-Based drug delivery system: Applications in fish biotechnology. **Polymers** MDPI AG, , 1 maio 2020. <https://doi.org/10.3390/polym12051177>.

XAVIER, Janifer Raj; RAMANA, Karna Venkata; SHARMA, Rakesh Kumar. β -galactosidase: Biotechnological applications in food processing. **Journal of Food Biochemistry**, v. 42, n. 5, 1 out. 2018. <https://doi.org/10.1111/jfbc.12564>.

YADAV, Jay Shankar Singh *et al.* Cheese whey: A potential resource to transform into bioprotein, functional/nutritional proteins and bioactive peptides. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 6, p. 756–774, 1 nov. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.07.002>.

YENKIE, Kirti M.; WU, Wenzhao; MARAVELIAS, Christos T. Synthesis and analysis of separation networks for the recovery of intracellular chemicals generated from microbial-based conversions. **Biotechnology for Biofuels**, v. 10, n. 1, 8 maio 2017. <https://doi.org/10.1186/s13068-017-0804-2>.

CAPÍTULO 3 – Secagem de células de *Kluyveromyces marxianus* com expressão da atividade de β -galactosidase por *spray drying*

RESUMO: *Kluyveromyces marxianus* é uma levedura produtora de β -galactosidase intracelular, obtida por fermentação submersa. Esse trabalho avaliou a secagem das células de *Kluyveromyces marxianus* por *spray drying* como método de recuperação da β -galactosidase. Assim, em um primeiro momento, estudou-se o efeito de diferentes temperaturas do ar de secagem (90, 120 e 150 °C) sem maltodextrina e com maltodextrina, como agente carreador, a (120 e 150°C). A secagem a 120 °C das células de *Kluyveromyces marxianus* com maltodextrina foi a condição em que a atividade enzimática foi maior (447,71 $\mu\text{mol/min}$), sendo a umidade desse pó 3,02%, atividade de água de 0,21, solubilidade de 82,63%, higroscopicidade de 16,4 g/100g massa seca e rendimento de 62%. Nesse contexto, continuou-se o estudo avaliando a adição de tripolifosfato de sódio (TPP) como agente reticulante de forma isolada e combinada com maltodextrina. Para avaliar a estabilidade ao armazenamento e morfologia por microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram selecionadas as seguintes condições de secagem a 120°C: i) sem maltodextrina; ii) com maltodextrina; iii) com TPP e, iv) maltodextrina combinado com TPP. A estabilidade térmica (30,35, 40 e 50°C) foi avaliada na célula seca a 120°C no spray Dryer com maltodextrina e maltodextrina e TPP. A combinação de maltodextrina e TPP se mostrou eficaz na preservação da célula com atividade de β -galactosidase ao contribuir para a preservação da atividade enzimática e estabilidade das células ao longo do tempo, demonstrando potencial para formulações com maior tempo de prateleira e aplicação industrial.

Palavras-chaves: Intolerância à lactose, agente carreador, reticulação e atividade enzimática.

ABSTRACT: *Kluyveromyces marxianus* is a yeast that produces intracellular β -galactosidase, obtained by submerged fermentation. This study evaluated the drying of *Kluyveromyces marxianus* cells by spray drying as a method for recovering β -galactosidase. Thus, initially, the effect of different drying air temperatures (90, 120, and 150 °C) without maltodextrin and with maltodextrin as a carrier agent (120 and 150 °C) was studied. Drying *Kluyveromyces marxianus* cells with maltodextrin at 120 °C produced the highest enzymatic activity (447.71 $\mu\text{mol/min}$). This powder had a moisture content of 3.02%, a water activity of 0.21, a solubility of 82.63%, a hygroscopicity of 16.4 g/100 g dry mass, and a yield of 62%. In this context, the study

continued by evaluating the addition of sodium tripolyphosphate (TPP) as a crosslinking agent, alone and in combination with maltodextrin. To evaluate storage stability and morphology by scanning electron microscopy (SEM), the following drying conditions at 120 °C were selected: i) without maltodextrin; ii) with maltodextrin; iii) with TPP; and iv) maltodextrin combined with TPP. Thermal stability (30, 35, 40, and 50°C) was evaluated in the dry cell at 120°C in a spray dryer with maltodextrin and maltodextrin and TPP. The combination of maltodextrin and TPP proved effective in preserving the cell with β -galactosidase activity by contributing to the preservation of enzymatic activity and cell stability over time, demonstrating potential for formulations with longer shelf life and industrial application.

Keywords: Lactose intolerance, carrier agent, cross-linking, and enzymatic activity.

3.1 INTRODUÇÃO

A β -Galactosidase (EC3.2.1.23), comumente chamada de lactase, que é responsável pela hidrólise da lactose, também, participa da síntese de galactooligossacarídeos (GOSs) e podem ser aplicadas em alimentos funcionais, como alimentos de baixa caloria ou como aditivo em laticínios fermentados, pães e bebidas. Além disso, com os avanços dos estudos da indústria farmacêutica, muitos sintomas causados pela intolerância à lactose são minimizados com a suplementação da β -galactosidase (GENNARI et al., 2023; MARTARELLO et al., 2019; MOVAHEDPOUR et al., 2022). A lactose é o principal carboidrato do leite, representa em média 4,7% da composição do leite de bovino e 7,2% do leite humano. Geralmente, os recém-nascidos expressam β -galactosidase suficiente para digerir a lactose do leite de mamíferos. Porém, o nível de expressão do gene LCT, que codifica a β -galactosidase no corpo humano, diminui gradativamente com o avançar da idade, isso resulta na má digestão da lactose (SHI et al., 2022).

As fontes de β -galactosidases podem ser de origem microbiana, animal ou vegetal. As fontes microbianas apresentam maior produtividade na sua síntese e uma ampla gama de enzimas produzidas pela mesma ou diferentes cepas microbianas. A escolha das fontes microbianas depende basicamente das condições de reação exigidas, sendo que, as β -galactosidases bacterianas são usadas principalmente para hidrólise ácida do soro de leite, com pH ideal entre 2,5 e 5,4. Em contrapartida, a β -galactosidase de levedura apresenta atividade máxima em pH 6,0–7,0, o que é mais adequado para a hidrólise de leite (MOVAHEDPOUR et al., 2022; SAQIB et al., 2017). Em relação às leveduras pode-se destacar as cepas de *Kluyveromyces*, sendo a *Kluyveromyces marxianus* uma cepa emergente no mercado. Esta levedura apresenta capacidade de crescer em diversas matérias-primas menos onerosas, como o soro de leite, além disso, pode se desenvolver em diferentes polissacarídeos, como inulina e pectina. Com o aumento da demanda mundial por biomoléculas na indústria alimentícia e em outros setores, explorar o potencial biotecnológico da *K. marxianus* torna-se cada dia mais importante. Com uma grande variedade de aplicações, incluindo a produção de enzimas, proteínas unicelulares, fermentação de etanol, desenvolvimento de vacinas e uso como probiótico (BILAL et al., 2022).

Os crescentes desafios ambientais ressaltam a necessidade de tecnologias industriais inovadoras e sustentáveis. Os bioprocessos, que utilizam células vivas ou seus componentes (como microrganismos e enzimas) para a produção de produtos desejados, são vistos como

alternativas promissoras e sustentáveis aos métodos convencionais. No entanto, a etapa de separação em bioprocessos é frequentemente cara e complexa, pois o produto alvo precisa ser recuperado de soluções aquosas diluídas. Foi relatado que aproximadamente dois terços dos custos totais de um bioprocessos estão relacionados ao *downstream* e, em alguns casos de síntese de proteínas, esse valor pode chegar a 90% (CHEN; LIANG; KONTOGEORGIS, 2023).

A secagem no *spray dryer* tem sido estudada em alguns bioprocessos, como método de recuperação, por ser um processo rápido e que permite certo controle sobre as propriedades do produto como tamanho e morfologia das partículas. Nesse método, uma solução é transformada em pó por meio da sua atomização em pequenas gotículas, que são expostas a um fluxo de ar aquecido, promovendo sua secagem rápida. As propriedades do pó podem ser influenciadas por vários parâmetros do processo, como a temperatura do processo, configurações de atomização, taxa de alimentação de líquido e fluxo de ar de secagem, bem como propriedades da solução de alimentação (LIPIÄINEN et al., 2018; LOPES et al., 2016).

Na secagem por *spray drying* os agentes carreadores podem ser utilizados para proteção contra o calor de compostos sensíveis, como enzimas, microrganismos ou bioativos, durante o processo de atomização. Os materiais mais comuns utilizados nos processos de secagem por *spray drying* são: maltodextrina, goma Arábica e suas combinações. Além disso, a proteína do soro de leite e caseinatos bem como outros polissacarídeos como quitosana, pectina e alginato, também são amplamente utilizados, tanto isoladamente quanto em combinação com os demais compostos citados (JAFARI; GHALEGI GHALENOEI; DEHNAD, 2017).

Para aprimorar propriedades como solubilidade, resistência mecânica e estabilidade térmica de materiais secos por atomização, podem ser utilizados agentes reticulantes. Esses compostos promovem a formação de ligações químicas ou iônicas entre macromoléculas, resultando em uma rede tridimensional estável. Os agentes reticulantes químicos tradicionais, podem apresentar preocupações devido à sua toxicidade ou ao desconhecimento de seu destino no organismo, exigindo etapas adicionais de purificação que aumentam os custos do processo. Nesse contexto, a reticulação iônica com o TPP tem se destacado por ser um método mais seguro, com condições processuais brandas e menor risco de toxicidade. O TPP oferece vantagens significativas, como biocompatibilidade, ausência de toxicidade e facilidade de uso em sistemas aquosos (DÍAZ VERGARA et al., 2023; SRIVASTAVA et al., 2016).

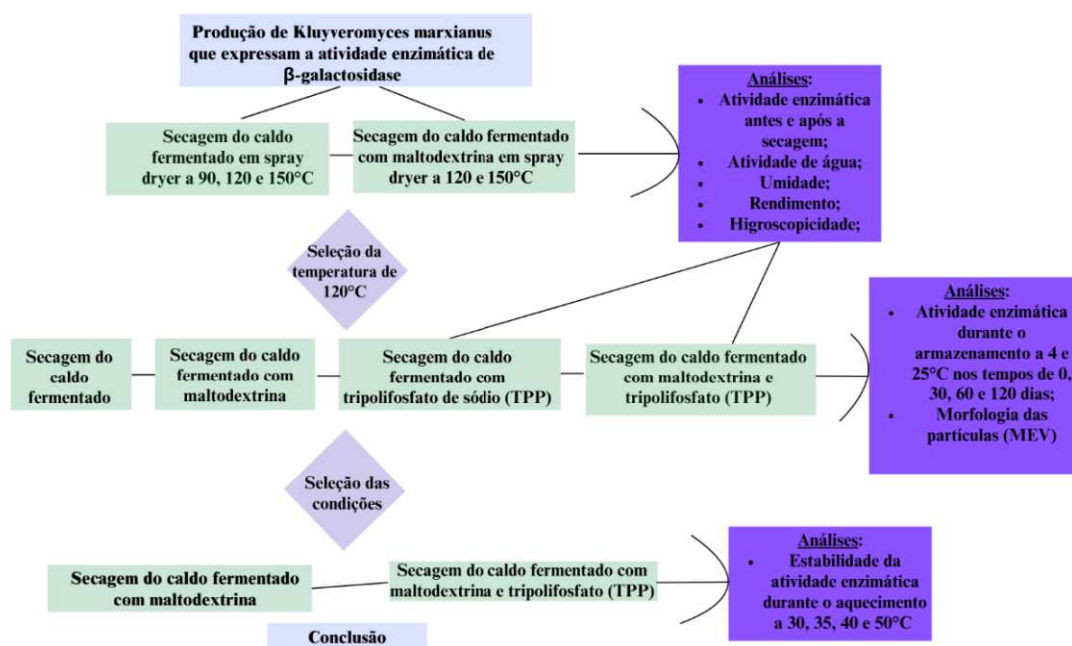
O objetivo desse trabalho foi estudar diferentes condições da secagem das células de *Kluyveromyces marxianus* por *spray drying* como método de recuperação da enzima β -galactosidase e o efeito do uso da maltodextrina e do TPP como agentes carreador e de reticulação, respectivamente, na estabilidade da atividade enzimática ao armazenamento e ao

tratamento térmico. Os diferentes pós (sem nenhum agente, com maltodextrina, com TPP, ou em combinação) foram avaliados quanto a sua estabilidade térmica e durante o seu armazenamento (em temperatura ambiente e refrigerada) e por fim estudos de caracterização microestrutural (MEV).

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

Na Figura 3.1 é ilustrado um fluxograma com as etapas realizadas para o desenvolvimento do estudo.

Figura 3.1- Fluxograma do desenvolvimento da metodologia experimental utilizada para produzir e secar as células de *Kluyveromyces marxianus* por *spray drying*



Fonte: produzido pelos autores, 2025.

3.2.1 Microrganismo, substratos e reagentes

Para a produção da β-galactosidase foi utilizado a cepa de *Kluyveromyces marxianus* ATCC 46537, levedura proveniente da Coleção de Culturas Tropicais da Fundação André Tosello de Campinas (SP), na forma reativada (slants sem duplicata). A cultura era repicada uma vez ao mês. O certificado de análise encontra-se no Anexo A.

O substrato, permeado de soro de leite em pó, utilizado na presente pesquisa foi gentilmente cedido pela empresa Lactosul, Indústria de Laticínios LTDA, Piranhas/Goiás -BR, e foi utilizado como fonte de lactose, na formulação dos meios de cultura para fermentação da levedura *K. marxianus* ATCC 46537. A especificação técnica do permeado de soro em pó, da marca Centro Oeste Laticínios, está apresentada no Anexo B.

Para a fermentação foi utilizado tampão fosfato de sódio 0,2M, em pH 5,5, e tampão fosfato de sódio 0,2 M, pH 7,0. Para a ressuspensão das células centrifugadas ao final do

processo fermentativo foi utilizado o tampão fosfato de potássio-hidróxido de sódio, concentração de 0,1M, pH 7,0, onde utilizou-se fosfato de potássio monobásico anidro e hidróxido de sódio, esse mesmo tampão foi utilizado para ressuspender as células secas para os testes de atividade enzimática. A maltodextrina (DE 20), como agente carreador e o TTP (Isofar Industria e Comércio de Produtos Químicos Ltda), como agente reticulante, foram utilizados em alguns experimentos com concentrações definidas durante a secagem por *spray drying*.

Para a análise de atividade enzimática foi utilizado como base para a reação a solução tampão láctico, ajustado o pH em 6,5 com solução de ácido clorídrico 0,1 M. A atividade do biocatalisador foi dosada pelo método da glicose-oxidase utilizando o kit Glicose Liquiform da Labtest. Todos os reagentes utilizados são de grau analítico exceto o permeado de soro de leite, o TPP e a maltodextrina.

3.2.2 Produção da enzima

A partir de uma cultura *start* de células da levedura *K. marxianus*, foram realizadas replicações mensais em meio *Yeast-Malt Extract Agar* (YMA), que foi mantida a 4°C para preservação. O meio YMA era composto por extrato de levedura (3 g/L), peptona (5,0 g/L), glicose (13,0 g/L) e ágar (20,0 g/L). O meio de cultura e as placas de petri foram esterilizados em autoclave vertical modelo CS (Primatec Indústria e Comércio LTDA - EPP), sob pressão de 1 atm, a 120°C, durante 20 minutos.

A produção das células com atividade de β -galactosidase foi realizada através do cultivo da levedura *K. marxianus* ATCC 46537. Para isso foram utilizados dois meios (inóculo e meio de fermentação) com substrato à base de permeado de soro de leite (PINHEIRO; BELO; MOTA, 2003; SANTIAGO, 2004). O inóculo foi preparado em tampão fosfato de sódio 0,2 M e pH 5,5. A composição do meio foi de lactose (50,0 g/L); 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 fermentativo foi preparado em tampão fosfato de sódio 0,2 M e pH 7,0, composto por lactose (100,0 g/L); sulfato de amônio (6,26 g/L); fosfato de potássio monobásico (5,0 g/L) e sulfato de magnésio heptahidratado (0,6 g/L). 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.

Após o preparo do meio inóculo e fermentativo, a fermentação foi iniciada com 75 mL de cada meio em um reator cônico de bancada (Erlenmeyer de 250mL) ocupando 30% do seu volume total e foram fechados com rolha de gaze e algodão e posteriormente esterilizados em autoclave. Após o resfriamento do meio até a temperatura ambiente, a levedura foi adicionada

ao meio e incubado a 30°C, a 120 rpm por 14 horas em incubadora refrigerada com agitação (marca TECNAL, modelo TE – 421, Brasil). A concentração de células foi aferida pela absorbância a 650 nm em espectrofotômetro (vis spectrophotometer modelo IL-226) e convertida em massa seca de células através da curva padrão de biomassa seca em função da absorbância, como apresentada no Apêndice A. Após o período de incubação, o inóculo foi centrifugado (marca Hermle Labortechnik, modelo Z 326 K, Alemanha) por 10 min a 6.000 rpm e o decantado foi transferido para o meio de fermentação na proporção de 5g de células/L 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. O caldo fermentado foi centrifugado e o decantado foi ressuspensionado em tampão fosfato de potássio-hidróxido de sódio, composto por 13,62 g/L de fosfato de potássio monobásico anidro e 4 g/L de hidróxido de sódio, na concentração de 0,1M, pH 7,0, obtendo uma suspensão celular de 75 g/L (DE SOUSA et al., 2021; NUMANOĞLU; SUNGUR, 2004).

3.2.3 Secagem no *spray dryer* com e sem agente carreador para diferentes temperaturas

Após a fermentação, a atomização foi realizada em *spray dryer* (marca LABMAQ, modelo LM MSD 1.0, Brasil) com capacidade de secagem de 1 L/h. O caldo fermentado centrifugado e ressuspensionado em tampão fosfato hidróxido de sódio, pH 7, foi seco na concentração celular de 75 g/L. O bico atomizador utilizado foi de 1,2 mm, fluxo de entrada de ar de 1,65 m³/min, fluxo da solução de alimentação igual a 0,6 L/h, taxa de atomização 40 L/min baseando em estudo realizado por Braga et al. (2019). Foram testadas 3 temperaturas: 90°C, 120°C e 150°C, sem a presença de agente carreador, e para as temperaturas de 120°C e 150°C foi estudado, também, a adição de maltodextrina a 2% (m/v), baseado em estudo anterior de Ribeiro et al. (2024). Para a secagem sem agente carreador foi utilizado o caldo fermentado obtido após o processo fermentativo. Enquanto para a secagem com agente carreador foi realizada a mistura da suspensão da levedura *K. marxianus* com a solução do agente carreador a 2% (m/v), na proporção de 1:10 homogeneizados por 20 minutos. A maltodextrina foi testada como agente carreador para analisar a influência na proteção da enzima na desnaturação que pode acontecer quando se utiliza altas temperaturas na secagem. Como agente reticulante foi selecionado a temperatura de secagem de 120°C e adicionado tripolifosfato de sódio a 1% (m/v), na proporção de 1:10 homogeneizados por 20 minutos. Foi realizada a atividade enzimática e análises físico-químicas do caldo fermentado, antes da secagem e do pó ressuspensionado, após a secagem, conforme item 3.2.4.1. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

3.2.4 Determinação da atividade enzimática e análises físico-químicas

As análises foram realizadas em triplicatas, conformes metodologias descritas na sequência.

3.2.4.1 Determinação da atividade enzimática

Para a determinação da atividade enzimática da β -galactosidase utilizou-se solução de lactose a 50 g/L, em tampão láctico recomendado pela Novo Nordisk (1993). A solução tampão láctico foi 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 dibásico (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.

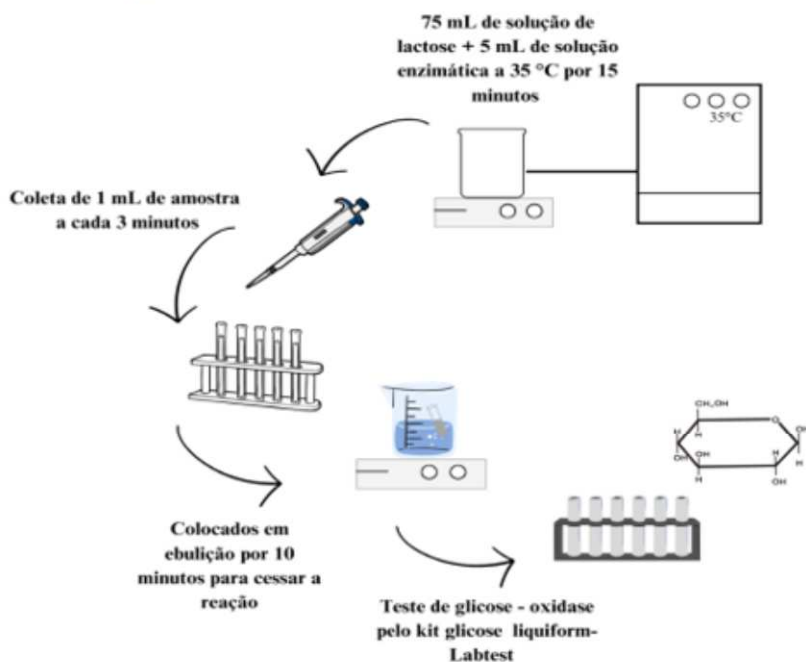
A atividade enzimática da β -galactosidase de *K. marxianus* ATCC 46537 foi determinada para as amostras da célula fermentada e para as amostras ressuspensas, na concentração inicial, após a secagem por *spray drying*. Os ensaios foram realizados em um reator de mistura operando em batelada, com volume total de 200 mL e altura de 8,2 cm e diâmetro interno de 5,5 cm, dotado de uma camisa de circulação de água para controle da temperatura, proveniente de banho termostatizado. A unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima que catalisa a conversão de 1 μ mol de glicose produzida por minuto.

Em cada experimento foi adicionado ao reator 5 mL do caldo da fermentação a 75 mL da solução de lactose (50 g/L), mantida a 35°C e pH 6,5 (SANTIAGO, 2004). Para as análises de atividade enzimática antes da secagem, utilizou-se diretamente o caldo fermentado contendo as células. Para as análises após a secagem por *spray drying*, o pó obtido foi ressuspense em solução tampão de fosfato de potássio-hidróxido de sódio 0,1 M (pH 7), na concentração de 75 g/L, determinada experimentalmente para corresponder à concentração celular obtida na fermentação.

Para a determinação da atividade enzimática utilizou-se o método das taxas iniciais, com coleta de cinco alíquotas de amostras do meio reacional nos tempos de 3, 6, 9 e 12 minutos, após a adição da amostra contendo a célula com expressão de β -galactosidase ao reator com a solução de lactose. Para a interrupção da reação, as amostras foram colocadas em tubos de

ensaio em ebulição por 10 min, conforme Figura 3.2. A glicose formada foi dosada pelo método da glicose-oxidase (BAO et al., 2004) utilizando o kit Glicose Liquiform da Labtest, conforme Apêndice B. Para o cálculo da atividade enzimática das amostras de pós produzidas com maltodextrina, descontou-se o valor da massa seca de aditivo (APÊNDICE C).

Figura 3.2 - Determinação da atividade enzimática



Fonte: produzido pelos autores, 2025.

3.2.4.2 Umidade

A análise de umidade foi determinada através do método gravimétrico. Para isso, foram colocados 1 g de amostra em cápsulas de porcelana pesadas anteriormente e levadas a estufa a 105 °C por 24 horas, ou até a massa da mesma permanecer constante, conforme a metodologia da A.O.A.C (2005). O resultado foi calculado, conforme Equação 3.1.

$$Umidade (\%): \frac{M_{\text{água}}}{M_t} \times 100 \quad (3.1)$$

Sendo, $M_{\text{água}}$ é a massa de água (g) e M_t é a massa total (massa de água e massa seca) utilizada como amostra (g).

3.2.4.3 Rendimento do processo de secagem

O rendimento foi calculado pela razão entre a massa de sólidos do produto em pó coletado e a massa de sólidos alimentados ao secador, conforme Equação 3.2:

$$\text{Rendimento de secagem (\%)}: \frac{M_{\text{pó}} (1 - M_{\text{água pó}})}{M_{\text{suspensão}} (1 - M_{\text{água suspensão}})} \times 100 \quad (3.2)$$

Sendo: $M_{\text{pó}}$ é a massa de pó coletada após o processo de secagem (g), $M_{\text{suspensão}}$ é a massa alimentada no *spray dryer* (g), $M_{\text{água pó}}$ e $M_{\text{água suspensão}}$ são as frações de água presentes no pó obtido através da secagem e na suspensão de *K. marxianus* que foi alimentada no *spray dryer*.

3.2.4.4 Atividade de água

A atividade de água (aw) foi determinada nas micropartículas secas. Para isso utilizou-se o equipamento analisador de atividade de água de bancada, AQUALAB (marca Decagon, modelo Pawkit, Estados Unidos).

3.2.4.5 Higroscopicidade

A higroscopicidade foi determinada através da metodologia adaptada de Cai and Corke, (2000) Cai and Corke, (2000). Para isso pesou-se 0,2 gramas das amostras em cápsulas de porcelana, e foram armazenadas em dessecador contendo solução saturada de cloreto de sódio, com umidade relativa de 70%, durante sete dias à temperatura ambiente, e calculada conforme apresentado na Equação 3.3:

$$H = \frac{m_{\text{ads}}}{M_{\text{ss}}} \times 100 \quad (3.3)$$

Em que H representa a higroscopicidade (g umidade adsorvida $\cdot 100\text{g}^{-1}$ de massa seca); m_{ads} é a massa de água adsorvida (g) e M_{ss} é a massa de sólidos secos (g). A massa seca da amostra é calculada conforme a Equação 3.4:

$$M_{\text{ss}} = (M_{\text{S}} - (M_{\text{S}} \times X_{\text{bu}})) \quad (3.4)$$

Em que M_{ss} é a massa de sólidos secos (g), M_s é a massa total da amostra (massa de água + massa de sólido seco) (g) e X_{bu} é a umidade em base úmida (g água/g de massa total da amostra).

3.2.4.6 Solubilidade

A solubilidade das amostras foi determinada conforme metodologia de Cano-Chauca et al. (2005). Pesou-se 0,5 g das amostras e adicionou a amostra em béqueres contendo 50 mL de água destilada. As amostras foram homogeneizadas à temperatura ambiente em uma placa de agitação por 30 minutos a 100 rpm. Após, a solução foi centrifugada em uma centrífuga de bancada digital (marca Hermle Labortechnik, modelo Z 326 K, Alemanha), por 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 por 24h até a massa se manter constante. O resultado foi calculado de acordo com a Equação 3.5.

$$\text{Solubilidade em água (\%)}: \frac{M_{ps}}{M_{pt}} \times 100 \quad (3.5)$$

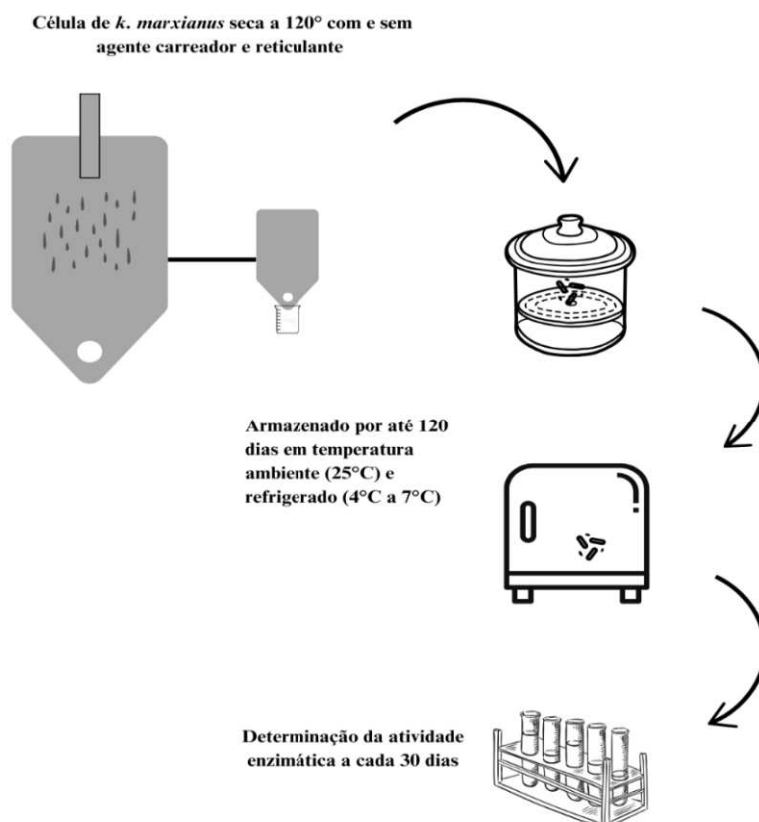
Sendo: M_{ps} a massa de pó no sobrenadante (g) e M_{pt} a massa de pó total (g).

3.2.5 Estabilidade ao armazenamento das células de *K. marxianus* que expressam atividade de β -galactosidase seca por *spray drying*

No estudo da estabilidade ao armazenamento a levedura *K. marxianus*, que expressa atividade de β -galactosidase, foi submetida à secagem por *spray dryer* a uma temperatura de 120°C, sendo esta temperatura de secagem escolhida por apresentar melhores resultados de atividade enzimática após a secagem. Foram realizados experimentos com agente carreador, maltodextrina e agente reticulante, o trifosfato de sódio (TTP) com o objetivo de analisar o efeito na estabilidade ao armazenamento quanto a manutenção da atividade enzimática. Foram avaliados os seguintes tratamentos: células sem agente carreador, células com maltodextrina a 2% (m/v), células com TTP a 1% (m/v) e células com a combinação de maltodextrina a 2% (m/v) e trifosfato de sódio a 1% (m/v). Após a secagem, as amostras foram armazenadas sob refrigeração (entre 4°C e 7°C) e em temperatura ambiente (25°C) com o objetivo de avaliar a estabilidade da atividade enzimática ao longo de 30, 60, 90 e 120 dias. Para o armazenamento, as amostras foram acondicionadas em embalagens duplas com zíper, devidamente identificadas e envolvidas em papel pardo para proteção contra a luz. O experimento foi conduzido em

triplicata. A atividade enzimática foi determinada pelo método das taxas iniciais, conforme o item 3.2.4.1. A atividade residual relativa (%) foi calculada em relação a atividade da obtenção da enzima seca no primeiro dia de armazenamento. Na Figura 3.3 está ilustrado o procedimento adotado para a avaliação da estabilidade da atividade enzimática durante o armazenamento.

Figura 3.3- Estabilidade ao armazenamento



Fonte: Elaborado pelos autores, 2025.

3.2.6 Estudo da estabilidade térmica da célula de *K. marxianus* que expressa atividade de β -galactosidase

A partir do estudo de estabilidade ao armazenamento, foram escolhidas as melhores condições e realizado o estudo da estabilidade térmica. A levedura *K. marxianus* foi submetida à secagem por *spray dryer* a temperatura de 120°C e as condições escolhidas foram: i) maltodextrina a 2% (m/v) e ii) a combinação de maltodextrina a 2% (m/v) e TPP a 1% (m/v). As amostras dos pós obtidos foram ressuspensas conforme descrito no item 3.2.4.1 e foram incubadas em banho termostático a diferentes temperaturas.

As soluções foram submetidas nas seguintes condições: 30°C (24 horas), 35°C (12 horas), 40°C (5 horas) e 50°C (30 minutos). Foram realizadas análises de atividade enzimática em duplicatas ao longo do tempo e determinada de acordo com o método descrito no item 3.2.4.1. Foram calculados a atividade enzimática residual em função do tempo de incubação, para cada temperatura e foram ajustados para os modelos de desativação térmica de primeira ordem (Equação 3.6) e por modelagem de desativação térmica com um estágio (Equação 3.7). Os ajustes foram realizados pelo método numérico Levenberg-Marquardt utilizando o software Statistica 8.0, determinando os parâmetros cinéticos por meio dos melhores ajustes (HENLEY; SADANA, 1985).

$$\frac{A}{A_0} = e^{(-K_d.t)} \quad (3.6)$$

$$\frac{A}{A_0} = (1 - \alpha_1). e^{(-K_d.t)} + \alpha \quad (3.7)$$

Sendo:

$\frac{A}{A_0}$ = atividade relativa;

$\alpha_1 = \frac{E_1}{E}$ = é a razão entre a atividade específica do estado final (E1) para uma modelagem de inativação com uma etapa e a atividade inicial (E);

K_d = constante cinética de desativação térmica.

Foram determinados os tempos de meia vida para cada temperatura utilizando as Equações 3.8 e 3.9. O cálculo foi realizado utilizando os parâmetros encontrados nas equações anteriores (3.6 e 3.7) considerando o melhor ajuste.

$$t_{\frac{1}{2}} = - \frac{\ln(0,5)}{K_d} \quad (3.8)$$

$$t_{\frac{1}{2}} = - \frac{1}{K_d} \ln\left(\frac{0,5-\alpha_1}{1-\alpha_1}\right) \quad (3.9)$$

A energia de ativação da desativação térmica foi calculada pela equação de Arrhenius linearizada (Equação 3.10).

$$\ln(k_d) = \ln(A *) - \frac{E_a}{R} \cdot \frac{1}{T} \quad (3.10)$$

Onde:

A^* = fator de frequência para a reação;

E_a = energia de ativação do processo de desativação térmica;

T = temperatura absoluta;

R = constante da lei dos gases.

3.2.7 Avaliação morfológica das células de *K. marxianus* seca por *spray dryer*

A análise morfológica das células de *Kluyveromyces marxianus* seca por *spray drying* a 120°C foi realizada por meio de microscopia eletrônica de Varredura (MEV) (Zeiss EVO MA 10, marca Oxford, modelo 51-ADD0048, Alemanha). Foram utilizadas amostras de células secas em 120°C, em *spray dryer* dos seguintes tratamentos: i) células sem agente carreador; ii) células com maltodextrina a 2% (m/v); iii) células com TPP a 1% (m/v) e, iv) células com a combinação de maltodextrina a 2% (m/v) e TPP a 1% (m/v). As amostras foram colocadas nos *stubs* utilizando uma fita de carbono dupla face, metalizadas em banho de ouro e visualizadas no MEV.

3.2.8 Análise dos dados

Os dados obtidos foram tabulados e os gráficos construídos utilizando o programa Microsoft Excel®. Para verificar se houve diferença significativa entre os dados por meio da ANOVA e Teste Tukey utilizou-se o programa estatístico Statistica® 8.0.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 Resultados da atividade enzimática e análises físico-químicas da secagem das células no *spray dryer* em diferentes temperaturas

As atividades de β -Galactosidase ao final das fermentações bem como do pó ressuspensionado estão apresentados na Tabela 3.1.

Tabela 3.1- Atividade enzimática da suspensão celular e após a secagem

Tratamento	Atividade enzimática da suspensão ($\mu\text{mol/min}$)	Atividade enzimática do pó ressuspensionado ($\mu\text{mol/min}$)
1	113,23 ^a $\pm$ 3,39	206,00 ^a $\pm$ 2,33
2	85,70 ^{ab} $\pm$ 4,88	246,40 ^b $\pm$ 17,32
3	60,89 ^b $\pm$ 2,84	447,71 ^c $\pm$ 34,17
4	73,40 ^b $\pm$ 4,17	130,9 ^d $\pm$ 1,63
5	90,76 ^{ab} $\pm$ 2,59	238,12 ^b $\pm$ 14,60

Tratamento 1: secagem a 90°C; **Tratamento 2:** secagem a 120°C; **Tratamento 3:** secagem a 120°C com maltodextrina; **Tratamento 4:** secagem a 150°C; **Tratamento 5:** secagem a 150°C com maltodextrina;

A atividade enzimática inicial da suspensão contendo a β -galactosidase apresentou uma variação devido a obtenção em diferentes bateladas de fermentação, que pode estar relacionada a diversos fatores intrínsecos ao processo biológico. Entre eles, destacam-se possíveis diferenças na concentração celular ao final da fermentação, no estágio do crescimento microbiano no momento da coleta, bem como em condições operacionais, como pH, temperatura, disponibilidade de nutrientes e aeração. Além disso, variações na manipulação experimental e na execução dos ensaios de atividade enzimática também podem contribuir para os resultados distintos entre as bateladas. Ainda, como a *Kluyveromyces marxianus* expressa β -galactosidase de forma intracelular, essa variação pode estar associada ao fato de a análise enzimática ter sido realizada após o processo de congelamento e descongelamento, que pode ter causado cisalhamento devido à formação de cristais de gelo.

Para a análise estatística dos dados, inicialmente foi realizado os testes de normalidade para verificar a aderência dos dados à distribuição normal, condição necessária para aplicação da análise de variância (ANOVA), que foi realizada utilizando o software Statistica® 8.0, e

após a aplicação dos dados a ANOVA, verificou-se que houve diferença significativa entre os tratamentos, e com isso foi realizado ao teste de Tukey a fim de verificar quais tratamentos apresentavam diferença entre si, sendo evidenciadas pelas letras sobrescritas nas médias.

O estudo da temperatura de secagem ideal para a secagem da solução fermentada é de suma importância para se obter pós enzimáticos de qualidade, com características de baixa umidade e atividade de água, alta atividade enzimática e estabilidade funcional. A *K. marxianus* produz β -galactosidase de forma intracelular, o que naturalmente protege essa enzima durante a secagem por *spray drying*. Essa localização celular resguarda a enzima, funcionando como uma barreira contra os efeitos nocivos da alta temperatura e da desidratação rápida, preservando a estrutura e a função da enzima, reduzindo a chance de desnaturação térmica e inativação. Assim, com relação à atividade enzimática após a secagem, observou-se um aumento nos valores obtidos, quando comparados à atividade antes da secagem.

Estatisticamente, os tratamentos 2 (secagem a 120°C) e 5 (secagem a 150°C com maltodextrina) não apresentaram diferença significativa entre si, porém diferiram dos demais. O tratamento que apresentou maior atividade enzimática foi o tratamento 3 (secagem a 120°C com maltodextrina como agente carreador), com valor de $447,71 \pm 34,17$ $\mu\text{mol}/\text{min}$. Durante o processo de secagem por pulverização, a adição de maltodextrina é frequentemente utilizada para proteger enzimas contra desnaturação térmica, o que foi evidenciado neste estudo. Para ambas as temperaturas avaliadas (120°C e 150°C), observou-se maior atividade enzimática nas amostras que continham maltodextrina em comparação àquelas sem o aditivo. Para a secagem sem agente carreador, a temperatura de 120°C (tratamento 2) resultou em maior atividade que a secagem a 90°C (tratamento 1), enquanto a secagem a 150°C (tratamento 4) levou a uma redução da atividade quando comparado a temperatura de 120°C, tanto nas condições com e sem maltodextrina. Esse comportamento indica que a temperatura de 150°C pode ser elevada para a manutenção da atividade da enzima.

De acordo com Silva et al. (2018) a temperatura é a variável de processo mais crucial na inativação microbiana, sendo uma medida direta da energia transferida por uma substância na forma de calor. Por isso, as condições de secagem devem ser ajustadas para minimizar perdas durante o processo. Além disso a temperatura do pó atomizado está diretamente relacionada ao dano térmico sofrido pelas células, resultando em uma taxa de mortalidade mais alta à medida que a temperatura do processo aumenta, embora que no presente estudo tal condição não foi avaliada.

No trabalho de Vasiljevic; Jelen, (2003) foi realizado a secagem por pulverização da β -Galactosidase intracelular de *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*, utilizando três

temperaturas diferentes do ar de saída (45, 55 e 65°C). Os autores não encontraram resultados satisfatórios, sendo que em todas as três temperaturas a retenção da atividade enzimática foi perdida em média de 90%. A enzima ao ser liofilizada também apresentou resultados parecidos, com mais de 90% de perda de atividade enzimática, isso pode ser justificado pelas alterações conformacionais da enzima no estado congelado. A β -Galactosidase de *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* também foi seca utilizando proteína do soro de leite, caseína, soro de leite e leite desnatado como agente carreador, dentre esses a combinação de temperatura do ar de saída a 45°C, utilizando soro de leite como agente carreador, manteve a retenção da atividade enzimática em até 60%.

A β -Galactosidase extracelular de *Aspergillus oryzae* foi seca por pulverização utilizando temperatura do ar de entrada de 190°C, e de acordo com os autores a enzima manteve a atividade relativa de 75% em relação a amostra controle. Ao utilizarem sacarose e Hidroxipropil- β -ciclodextrina como agente carreador, a atividade relativa foi mantida de 71,5 e 98,3%, respectivamente (BRANCHU et al., 1999).

Mukundan et al. (2020) realizaram um estudo para obtenção de β -galactosidase de *Streptococcus lactis* secas por pulverização com nanopartículas de sílica em diferentes temperaturas, a maior atividade foi observada na temperatura de entrada de 90°C e a menor foi a 160°C. As células imobilizadas mostraram um aumento na atividade enzimática na faixa de pH de 4,0 a 7,0, e apresentaram quase 80% de sua atividade inicial após 8 usos repetidos. A secagem por pulverização sob condições otimizadas apresentou ser um método fácil, escalonável e econômico para o aprisionamento de células *S. lactis* expressando β -galactosidase em matriz de sílica.

No estudo de Estevinho et al. (2014) foi investigada a produção de micropartículas contendo β -galactosidase, utilizando diferentes biopolímeros como agente carreador (goma Arábica, quitosana, quitosana modificada, alginato de cálcio e alginato de sódio). As soluções contendo enzima-biopolímero foram secas em *spray dryer*, de forma separadas e com as seguintes condições: vazão da solução e do ar, temperatura de entrada e pressão do ar foram ajustadas para 4 mL/min, 32 m³/h, 115°C e 6,5 bar, respectivamente. A concentração de agente carreador foi de 1% (p/v). O estudo apresentou atividades enzimáticas residuais de β -galactosidase de 20% para quitosana modificada, 37% para goma Arábica, 20% para alginato de cálcio e 13% para alginato de sódio. Esses resultados evidenciam que a escolha adequada do agente carreador pode atenuar os efeitos da desnaturação térmica durante a secagem, contribuindo para a preservação da atividade enzimática. Além disso, são mais um indício de que a secagem da enzima intracelular (como no presente estudo) representa uma barreira

protetiva contra a desnaturação em comparação com a secagem (mesmo com agentes carreadores) da enzima livre.

Em relação aos resultados físico-químicos, as amostras apresentaram baixa umidade e baixa atividade de água, características que são desejáveis para uma boa estabilidade ao longo do tempo desses produtos. Os resultados obtidos para os 5 tratamentos estão apresentados na Tabela 3.2.

Tabela 3.2: Parâmetros físicos-químicos das amostras secas e rendimento de secagem

Tratamento	Atividade de água (a_w)	Umidade (%)	Rendimento (%)	Solubilidade (%)	Higroscopicidade (g/100 g de matéria seca)
1	$0,37^a \pm 0,03$	$7,8^a \pm 1,12$	$59,3^{ab} \pm 2,34$	$47,74^a \pm 0,12$	$24,9^a \pm 0,01$
2	$0,27^b \pm 0,02$	$6,8^a \pm 1,30$	$76^a \pm 3,69$	$44,98^b \pm 1,53$	$25,19^a \pm 1,25$
3	$0,22^b \pm 0,02$	$3,02^b \pm 0,27$	$62,3^{ab} \pm 3,25$	$82,63^c \pm 0,46$	$16,4^b \pm 0,47$
4	$0,21^b \pm 0,04$	$5,6^{ab} \pm 0,55$	$73,4^{ab} \pm 14,07$	$39,86^d \pm 0,1$	$24,39^a \pm 2,28$
5	$0,25^b \pm 0,01$	$3,55^b \pm 1,33$	$42,63^b \pm 19,53$	$85,26^e \pm 0,77$	$15,09^b \pm 0,41$

Tratamento 1: secagem a 90 °C; **Tratamento 2:** secagem a 120 °C; **Tratamento 3:** secagem a 120 °C com maltodextrina; **Tratamento 4:** secagem a 150 °C; **Tratamento 5:** secagem a 150 °C com maltodextrina;

A atividade de água (a_w) para os tratamentos estudados variaram de $0,21 \pm 0,04$ a $0,37 \pm 0,03$. Pelo teste de Tukey não houve diferença significativa entre os tratamentos 2, 3, 4 e 5, mas houve entre o tratamento 1 e os demais. Foi notável que quando a temperatura de secagem aumentou a a_w do pó diminuiu, isso pode ser explicado pelo aumento da taxa de transferência de calor para as partículas em temperaturas mais elevadas, aumentando a força para a evaporação e provocando maior remoção de água. Além disso, é relatado pela literatura que valores abaixo de 0,6 desfavorecem reações microbiológicas e algumas bioquímicas pois a quantidade de água livre disponível para essas reações é baixa (DANTAS et al., 2018; MARTINS et al., 2019).

Já para a análise de umidade os valores oscilaram de $3,02 \pm 0,27$ a $7,8 \pm 1,12\%$ entre os tratamentos. Observou-se que, à medida que a temperatura de secagem aumentou, a umidade das amostras diminuiu. Isso acontece porque em temperaturas mais elevadas de atomização, aumenta-se o gradiente térmico dentro da câmara de secagem, e assim facilita a transferência de calor, acelerando o processo de desidratação. Além disso, a análise estatística revelou diferenças significativas entre os tratamentos 3 e 5 em relação aos demais, demonstrando que a

adição de maltodextrina contribuiu para a redução da umidade. Esse efeito pode estar associado às propriedades higroscópicas do agente carreador, que facilita a remoção de água durante a atomização, resultando em um pó com menor teor de umidade e, assim, podendo ofertar maior estabilidade ao armazenamento.

Braga et al. (2019) ao avaliarem a temperatura de secagem no processo de microencapsulação de conídios de *Trichoderma asperellum* por *spray drying* verificaram umidades abaixo de 6% na microencapsulação a 90°C, quando foi utilizado temperaturas menores a umidade foi inversamente proporcional. You et al. (2017) ao secarem β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* em *spray dryer* com temperatura de 200°C observaram umidade de 5,68% sem utilizar nenhum agente carreador e 5,48% utilizando maltodextrina como agente carreador. No presente trabalho foi observado resultados semelhantes nas secagens em temperaturas de 120°C e 150°C. Sendo assim, resultados próximos a 5% de umidade podem ser considerados um produto com boa estabilidade ao armazenamento (GHANDI et al., 2012).

A solubilidade dos pós obtidos pela secagem no *spray dryer* pode ser afetada por diversos parâmetros, como as composições iniciais da solução a ser seca, se possui ou não agente carreador, as taxas de fluxo de ar comprimido e as taxas de alimentação. Além disso, quando a temperatura de atomização é elevada, pode-se formar uma camada de superfície dura na partícula de pó, o que pode impedir que as moléculas de água se disseminem, e isso reduz a dissolução do pó (JAFARI et al., 2017). Estatisticamente, houve diferença significativa entre todos os tratamentos aplicados, sendo que a adição de maltodextrina promoveu um aumento na solubilidade das amostras.

Um dos parâmetros que permite que as enzimas se dissolvam rapidamente em soluções aquosas e retomar sua atividade catalítica de maneira eficiente é a solubilidade. No presente estudo os resultados encontrados para solubilidade foram na faixa de $39,86 \pm 0,1$ a $85,26 \pm 0,77\%$ para os 5 tratamentos. Ribeiro et al. (2024) ao secarem, por atomização, a β -galactosidase de *K. marxianus* a 90°C utilizando alginato de sódio, goma arábica, proteína isolada de soja, e maltodextrina encontraram valores de solubilidade entre $43,9 \pm 1,0$ a $85,9 \pm 0,9 \%$, sendo o tratamento com maltodextrina apresentando maior solubilidade ($85,9 \pm 0,9 \%$) semelhante ao presente estudo que utilizou maltodextrina como agente carreador e obteve aumento na solubilidade em até $85,26 \pm 0,77$. Isso pode ser explicado devido as propriedades da maltodextrina em ajudar a melhorar a solubilidade do pó ao atuar como uma proteção para a enzima contra o calor, uma vez que esse tipo de carboidrato utilizado como agente carreador substitui a água nas interações por pontes de hidrogênio e formam uma matriz vítrea que

estabiliza a estrutura da proteína, impedindo que as moléculas da enzima se agreguem de forma irreversível e facilitando a reidratação e dissolução da enzima (CAVALCANTI et al., 2020).

A amostra alimentada no *spray* possuía característica homogênea e durante a realização das secagens não ocasionou nenhum entupimento no equipamento, problemas que normalmente ocorrem em secagens envolvendo materiais altamente viscosos ou insolúveis em água (MOEJES et al., 2018). Embora a maltodextrina seja convencionalmente utilizada para aumentar o rendimento na secagem por *spray drying*, no presente estudo sua adição resultou em maior quantidade de material aderido às paredes da câmara de secagem, reduzindo o rendimento em comparação ao tratamento sem carreador. No presente estudo, houve diferença significativa entre os tratamento 2 e os demais, sendo este tratamento o que apresentou maior rendimento ($76 \pm 3,69$).

As maltodextrinas com menores valores de dextrose equivalente ($>21DE$) são consideradas boas opções de agentes carreadores, devido às suas propriedades, como alta solubilidade e baixas viscosidades em alto teor de sólidos. Além disso, elas possuem alto peso molecular e temperatura de transição vítrea (T_g), portanto, adequadas como agentes antiaderentes (AZHAR et al., 2020). Nesse trabalho utilizou maltodextrina DE 20, considerada uma dextrose alta, que associada à composição da formulação (caldo fermentado com células) pode ter gerado partículas com T_g reduzida e camadas viscosas que permanecem aderidas a câmara de secagem durante o processo (SIEMONS et al., 2020).

Braga et al. (2019) investigaram a microencapsulação por *spray drying* de *Trichoderma asperellum*, utilizando maltodextrina D20 como material de parede, as condições utilizadas no estudo foram vazão de alimentação 0,6 L/h temperatura de entrada 80°C; concentração do material de parede de 8 m/V. Neste estudo, os autores obtiveram rendimento de secagem de 66,64% com material de parede e 49,01% sem material de parede, resultado oposto ao obtido no presente estudo, utilizando também a maltodextrina DE20. Entretanto, DESCAMPS et al., (2013) avaliaram a T_g da maltodextrina DE21 seca e encontraram, por extrapolação, valores de T_g próximos a 162°C. A DE21 é estruturalmente muito próxima de DE20, e em misturas com água, esse valor pode diminuir.

No estudo de Braga et al. (2019), a secagem por *spray drying* foi realizada a 80°C — bem abaixo da T_g — o que favoreceu a formação de partículas livres e reduzida aderência. Já no presente trabalho, as temperaturas aplicadas de 120°C e 150°C estão muito próximas da T_g da maltodextrina, o que pode ter resultado em partículas mais viscosas sendo parcialmente aderidas às paredes do spray dryer, explicando o menor rendimento, mesmo com o uso do carreador.

Outro ponto que pode ter influenciado é que a concentração de maltodextrina utilizada por Braga et al. (2019) na solução foi superior à do presente trabalho, que correspondeu à proporção de 1:5 (massa seca de conídios de *Trichoderma asperellum*:massa seca de material de parede). Assim, a menor concentração de maltodextrina utilizada neste estudo pode não ter sido suficiente para exercer seu efeito antiaderente de forma eficiente, favorecendo maior aderência do material às paredes do secador e diminuindo o rendimento da secagem.

A higroscopicidade das enzimas é uma característica importante que influencia a estabilidade, a armazenagem e a eficácia dessas enzimas. A fim de mitigar os efeitos negativos da higroscopicidade, é comum utilizar agente carreador como maltodextrina ou outros carboidratos, durante o processo de secagem por *spray drying*. Esses agentes ajudam a formar uma barreira protetora ao redor das partículas enzimáticas, reduzindo a absorção de umidade (GOULA; ADAMOPOULOS, 2008). Segundo a classificação da GEA Niro Research Laboratory (2015), o pó não é higroscópico quando os valores de higroscopicidade se encontram abaixo de 10,1 g/100ms, ligeiramente higroscópico quando se encontram entre 10,1 - 15,0 g/100ms e higroscópico quando estão na faixa de 15,1 - 20,0 g/100ms, desta forma os pós enzimáticos obtidos pela secagem no *spray dryer* poderiam ser classificados como higroscópicos, pois para todos os Tratamentos foram encontrados valores de higroscopicidade, variando na faixa de $15,55 \pm 0,58$ a $25,19 \pm 1,25\%$. Em termos práticos, esse resultado indica que esse produto apresenta tendência em adsorver umidade, podendo ocorrer processos de aglomeração, perda de fluidez, reações químicas e microbiológicas indesejáveis, que inclusive prejudiquem a atividade enzimática. Para evitar que esse tipo de fenômeno aconteça são necessários cuidados com a embalagem a ser utilizada e as condições de armazenamento. Em seu estudo, Ribeiro et al. (2024) encontraram valores de higroscopicidade variando entre $11,3 \pm 0,1$ a $69,76 \pm 1,11$, ao secar uma β -galactosidade de *K. marxianus* a 90°C utilizando diferentes materiais de parede (agentes carreadores) que contribuíram para essa amplitude de higroscopicidade observada.

Wang et al. (2019) estudaram o efeito das condições de secagem por atomização nas propriedades dos pós obtidos a partir de polipeptídeos extraídos de desnatado de soja por meio de extração aquosa assistida por enzimas. As variações de temperaturas utilizadas foram de 140°C, 160°C, 180°C e 200°C. Ao avaliarem as propriedades físico-químicas dos pós obtidos encontraram valores de a_w entre 0,37 e 0,55. Os autores observaram que quanto maior a temperatura de atomização menor a a_w , assim como no presente estudo. O índice de solubilidade variou de 82,31% a 93,93%, valores superiores ao do presente estudo. O valor máximo de

solubilidade foi obtido com temperatura de secagem de entrada de 200°C, o inverso foi encontrado neste trabalho.

Ribeiro et al. (2024) ao secarem por atomização a β -galactosidade de *K. marxianus* a 90°C encontraram valores de umidade, a_w , solubilidade, higroscopicidade e rendimento de 5,7%, 0,29, 43,9 (%), 21,37 (g/100g de dm), e 60,53%, respectivamente, e ao utilizarem maltodextrina como agente carreador os valores das análises foram de 4,38% de umidade, atividade de água de 0,4, solubilidade de 85,9 (%), higroscopicidade de 11,43 (g/100g de dm), e 20,4% de rendimento. Semelhante ao presente estudo, os autores discutiram que ao utilizarem maltodextrina DE 20 como agente carreador para a microencapsulação da enzima a 90°C, houve diminuição no rendimento devido a aderência do pó nas paredes do ciclone do *spray dryer*, apresentando rendimento de 20,4%.

Por meio dos resultados das Tabelas 3.1 e 3.2, observou-se que os tratamentos 2 e 3 (secagem a 120°C sem e com maltodextrina, respectivamente) foram os que apresentaram, no geral, propriedades físico-químicas interessantes para β -galactosidade em pó. Especialmente o tratamento 3 reduziu significativamente a umidade do pó e a higroscopicidade, o que aumenta a estabilidade e vida útil da enzima seca. Também foi uma condição que resultou em um pó com maior solubilidade, facilitando sua dissolução rápida em água, algo essencial para aplicações industriais e alimentícias. No entanto, um problema observado foi a adesão excessiva do pó nas paredes do equipamento durante a secagem, o que diminuiu o rendimento do processo. Mesmo assim, o rendimento foi em torno de 60%. Assim, elegeu-se a temperatura de 120°C para a avaliação da estabilidade desse produto durante o armazenamento. A partir dessa condição resolveu-se também estudar o efeito do TPP como um agente reticulante, com e sem a maltodextrina.

A célula com expressão de β -galactosidase seca a 120°C com o uso de TPP como agente reticulante apresentou atividade enzimática de 56,65 $\mu\text{mol/min}$, rendimento do processo de secagem de $53,92 \pm 9,8\%$, atividade de água de $0,285 \pm 0,02$, umidade de $4,83 \pm 1,04\%$, solubilidade de $86,79 \pm 0,27\%$ e higroscopicidade de $38,63 \pm 1,39$ g/100g de dm.

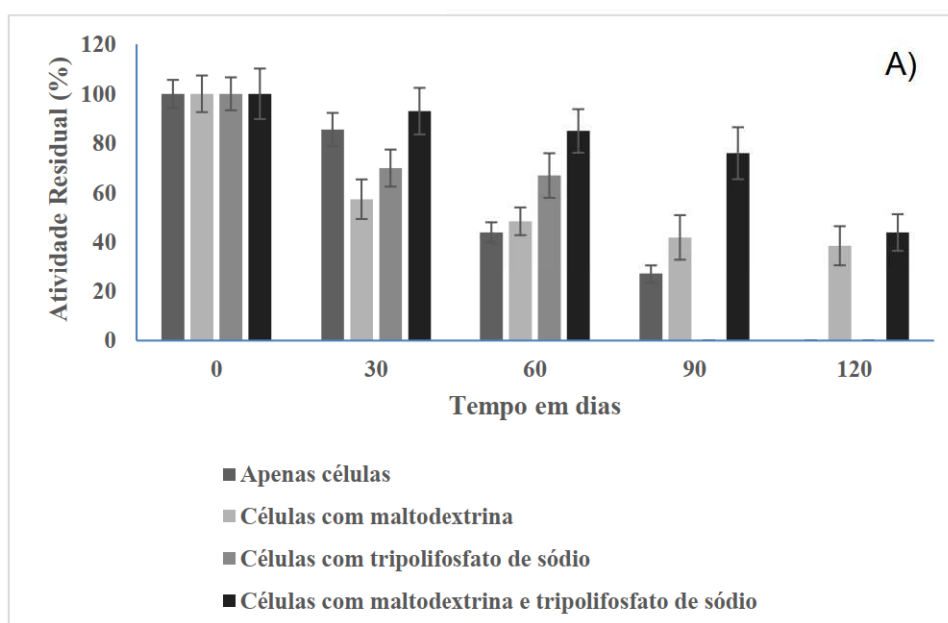
A célula com expressão de β -galactosidase seca a 120°C com o uso de TPP como agente reticulante e maltodextrina como carreador apresentou atividade enzimática de $143,9 \pm 10,47$ $\mu\text{mol/min}$, rendimento do processo de secagem de $63,31 \pm 5,45 \%$, atividade de água de $0,244 \pm 0,01$, umidade de $2,96 \pm 0,97\%$, solubilidade de $88,88 \pm 0,57\%$ e higroscopicidade de $23,426 \pm 0,48$ g/100g de dm. Tendo em vista esses resultados as análises seguiram para avaliação da morfologia das partículas através do MEV, estabilidade ao armazenamento e estabilidade térmica.

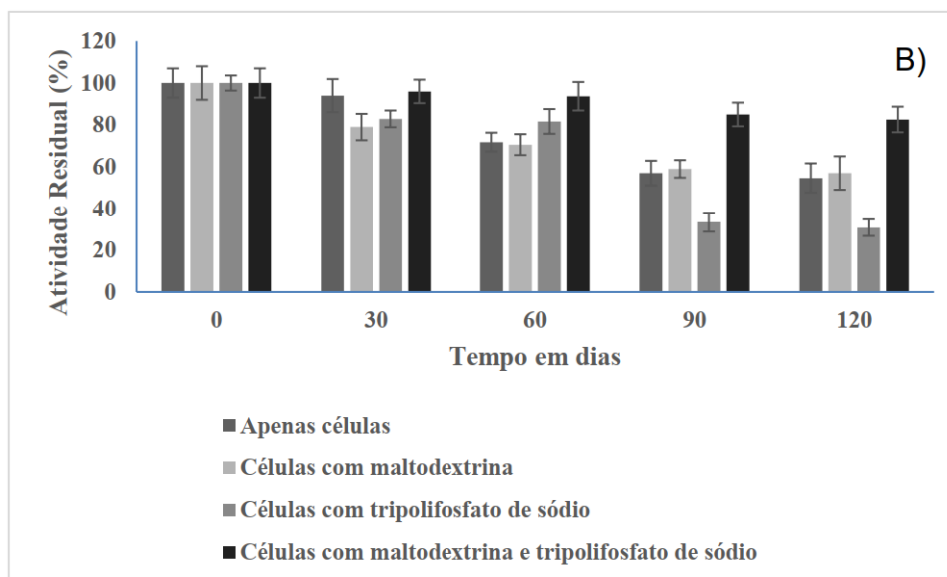
3.3.2 Estabilidade ao armazenamento das células de *K. marxianus* que expressam atividade de β -galactosidase seca por *spray drying*

Após a secagem, por pulverização a 120°C das células de *K. marxianus* que expressam a atividade de β -galactosidase, os pós foram armazenados durante 120 dias à 4°C (refrigerada em geladeira) e 25°C (ambiente) e a atividade enzimática foi analisada a cada 30 dias para avaliar a estabilidade do pó em relação ao armazenamento. Para essa finalidade, as amostras foram acondicionadas em embalagens duplas com zíper, devidamente identificadas e envolvidas em papel pardo para proteção contra a luz tanto as amostras armazenadas em temperatura ambiente quanto refrigerada.

Na Figura 3.4 são apresentados os resultados de atividade residual ao longo do tempo das células sem agente carreador, células com maltodextrina a 2% (m/v), células com TPP a 1% (m/v) e células com a combinação de maltodextrina a 2% (m/v) e TPP a 1% (m/v). Na Figura 3.4 são apresentados os resultados das amostras armazenadas sob refrigeração (4°C) e os resultados das amostras que foram armazenadas em temperatura ambiente a 25°C.

Figura 3.4-Estudo da estabilidade ao armazenamento da célula de *K. marxianus* que expressa atividade de β -galactosidase: A) produto armazenado à 4°C e B) à 25°C.





Os resultados indicam que a estabilidade da atividade enzimática foi significativamente afetada pela temperatura de armazenamento. Nas células secas sem agente carreador houve uma redução da atividade enzimática com o tempo de armazenamento, tanto na temperatura de refrigeração quanto no ambiente. Em temperatura ambiente, observou-se uma queda acentuada na atividade residual, reduzindo-se de 100% para 0% ao final do período analisado, com perdas mais expressivas após os primeiros 60 dias. Compensatoriamente, em condição refrigerada, a atividade enzimática apresentou uma redução mais gradual, mantendo 54,66% da atividade inicial após 120 dias. Com isso, sugere-se que a refrigeração desempenha um papel de extrema importância na preservação da atividade enzimática, retardando a perda de funcionalidade ao longo do tempo de armazenamento.

Em relação aos demais tratamentos utilizados, para as células secas com maltodextrina como agente carreador, os resultados demonstram uma preservação mais eficiente da atividade enzimática em comparação com as células que foram secas sem agente carreador. Em temperatura ambiente, a atividade residual apresentou uma queda mais lenta, mas de forma progressiva, reduzindo de 100% para 38,64% após o período de 120 dias, enquanto na condição refrigerada, a perda foi menos acentuada, mantendo 57,30% da atividade inicial ao final do período. A maltodextrina demonstrou um efeito protetor, reduzindo a taxa de perda da atividade enzimática em ambas as condições submetidas ao armazenamento. Claramente o uso de maltodextrina melhorou a estabilidade da atividade da célula que expressa atividade de β -galactosidase, porém a refrigeração demonstrou ser, novamente, um fator importante para a preservação.

Os resultados da estabilidade ao armazenamento de células secas com a combinação de maltodextrina e TPP mostram que esta condição fornece uma proteção mais eficiente em comparação com as demais condições avaliadas, inclusive em relação a secagem da célula apenas com o TPP. Em temperatura ambiente, a atividade residual diminuiu para 43,97% após 120 dias, indicando uma perda progressiva, porém mais lenta em relação às condições com células sem agente carreador (0%) e com maltodextrina isolada (38,64%). Na condição refrigerada, foi apresentado maior estabilidade, com perda apenas de 17,38% em relação a atividade inicial após 120 dias de armazenamento. Esses resultados reforçam que a combinação de maltodextrina com TPP atua de forma sinérgica, protegendo a enzima e garantindo maior estabilidade, inclusive em temperatura ambiente.

Os resultados de estabilidade ao armazenamento de células secas com TPP como agente reticulante indicaram uma proteção parcial da atividade enzimática, com desempenho inferior ao da combinação com maltodextrina. Na condição com apenas com TPP, em temperatura ambiente, houve uma rápida perda de atividade, atingindo 0% aos 90 dias. Visualmente para essa condição, observou-se que alterações nas características da amostra. Para esse tempo, provavelmente as amostras adsorveram umidade e apresentaram uma textura pegajosa, comprometendo sua integridade e tornando-as inadequadas para as análises. Em condição refrigerada, a estabilidade foi mantida por mais tempo, mas com uma redução significativa da atividade enzimática, chegando a 30,80% ao final de 120 dias. Esses dados sugerem que, embora o TPP forneça certa proteção inicial, ele é menos eficaz quando usado sem agente carreador, especialmente em temperatura ambiente.

O TPP é um agente reticulante polianiónico que atua promovendo ligações cruzadas eletrostáticas entre grupos amino da superfície celular, conferindo estrutura e certa proteção à enzima intracelular. No entanto, essas ligações são geralmente frágeis, especialmente sob condições de alta umidade e temperatura, o que pode explicar a rápida perda de integridade estrutural e da atividade enzimática observada nas amostras armazenadas à temperatura ambiente (DI SANTO et al., 2021). Por outro lado, a maltodextrina forma uma matriz sólida ao redor das células durante a secagem, atuando como uma barreira física aos fatores ambientais e contribuindo para maior estabilidade do sistema (DESCAMPS et al., 2013). O TPP é comumente utilizado como agente reticulante na microencapsulação de enzimas e outros compostos bioativos, especialmente em sistemas baseados em quitosana, um polissacarídeo catiónico. No estudo de Busto et al. (2022), os autores encapsularam proteases utilizando quitosana, e promoveram a reticulação com TPP. As microcápsulas formadas apresentaram alta

eficiência de encapsulamento e maior estabilidade enzimática em comparação com aquelas produzidas sem o agente reticulante.

Embora maltodextrina e a quitosana (utilizada no trabalho de Busto et al. (2022)) sejam estruturalmente distintas (a primeira, um polissacarídeo neutro e amorfo; a segunda, um polímero com caráter catiônico) os resultados observados neste estudo em comparação com a literatura sugerem que, em ambos os casos, a presença simultânea de TPP e um agente formador de matriz pode atuar sinergicamente na proteção da enzima. A reticulação promovida pelo TPP tende a estabilizar a estrutura superficial das células, enquanto a matriz vítrea formada pelo carreador (como a maltodextrina) reforça essa estabilidade ao limitar a difusão de água e proteger contra estresses térmicos e oxidativos. Como resultado, formam-se partículas mais estáveis, com menor higroscopicidade e maior retenção da atividade enzimática ao longo do armazenamento. Assim, essa possível sinergia entre a reticulação química promovida pelo TPP e a proteção física oferecida pelos agentes carreadores contribui de forma relevante para a preservação da estrutura celular e da funcionalidade enzimática, especialmente sob condições ambientais desfavoráveis, o que não é observado tão expressivamente apenas com o agente encapsulante e muito menos utilizando somente o reticulante.

Ribeiro et al. (2024) avaliaram a estabilidade ao armazenamento de células que expressam atividade de β -galactosidase secas a 90°C por *spray drying* durante aproximadamente 56 dias (8 semanas), as amostras analisadas foram com: controle (apenas células) e células microencapsuladas com os diferentes agentes (maltodextrina, goma arábica, alginato de sódio e proteína isolada da soja). Comparando com os resultados obtidos no presente estudo, pode-se observar que as micropartículas formadas com maltodextrina, proteína isolada de soja e células sem material de parede mantiveram atividade residual superior a 80% após oito semanas em ambos os tipos de armazenamento. Em contraste, as micropartículas com alginato de sódio e goma arábica apresentaram menor estabilidade, com atividade inferior a 60%. Embora o armazenamento refrigerado tenha demonstrado melhor preservação em relação à temperatura ambiente, a diferença na atividade residual entre as condições não ultrapassou 20% ao final do período estudo pelos autores. Foi observado maior perda de atividade enzimática nas primeiras quatro semanas para todos os tratamentos, mas as células sem material de parede sofreram maior redução entre a quarta e a oitava semana em ambas as condições.

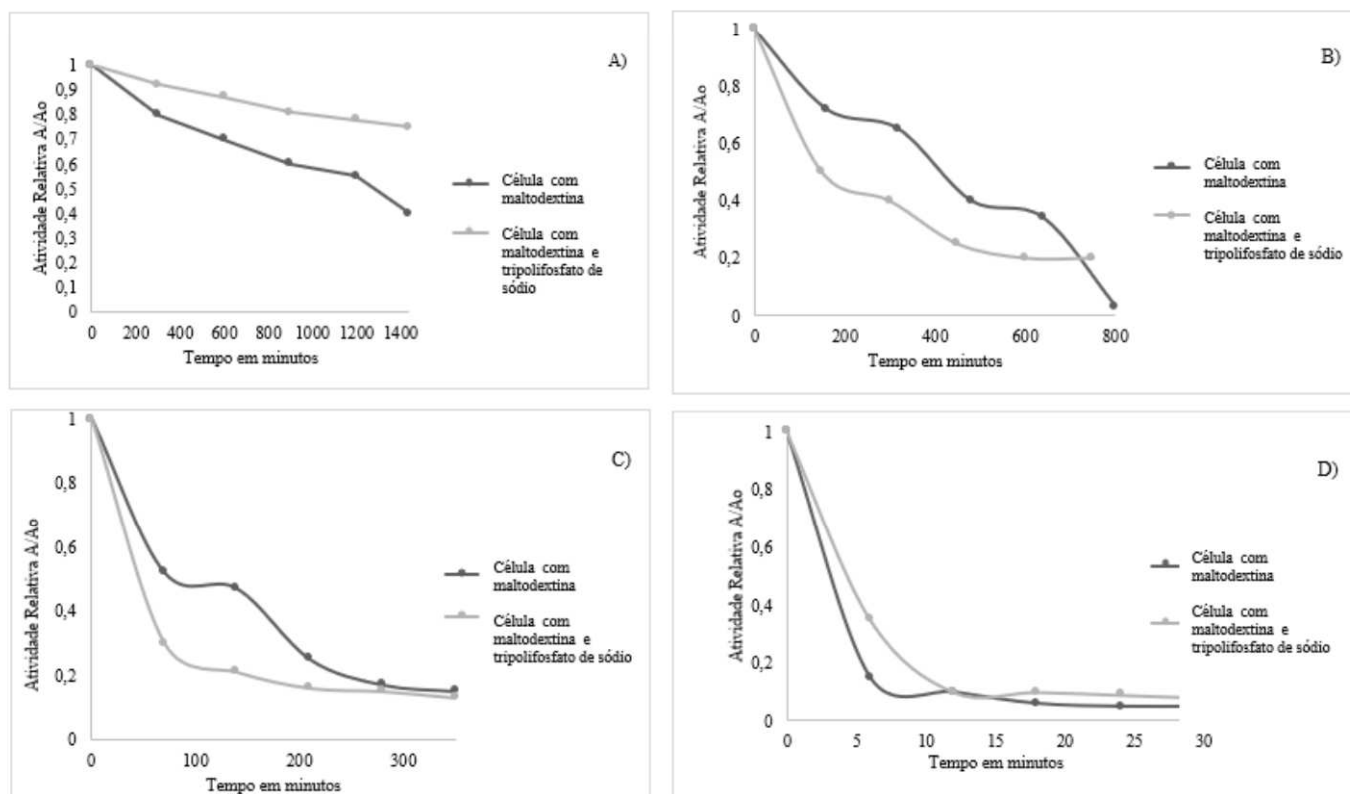
Em comparação, os resultados do presente trabalho indicam uma perda mais acentuada na atividade enzimática ao longo de 120 dias, especialmente em temperatura ambiente, onde as células secas sem agente carreador não apresentaram atividade residual e as amostras com maltodextrina apresentaram 38,64%. A combinação de maltodextrina com TPP proporcionou

maior proteção, preservando 43,97% da atividade em temperatura ambiente e 82,62% sob refrigeração, evidenciando um efeito sinérgico entre os dois agentes. Embora as diferenças metodológicas e do tempo de armazenamento, ambos os estudos reforçam que a utilização de agentes protetores, especialmente a maltodextrina, e o armazenamento refrigerado são fatores cruciais para a preservação da atividade enzimática. Além disso, a combinação de maltodextrina e TPP na temperatura de secagem a 120°C promoveu menor atividade de água e umidade, apresentou menor higroscopicidade em relação ao uso do reticulante sozinho ou da célula sem nenhum aditivo, fatores que são cruciais para melhor estabilidade ao armazenamento.

3.3.3 Estudo da estabilidade térmica da célula de *K. marxianus* que expressa atividade de β -galactosidase seca por *spray drying*

A estabilidade da enzima β -galactosidase é influenciada pela temperatura, tornando essencial sua avaliação em diferentes condições térmicas, especialmente visando sua utilização em condições de processamento que envolvam a temperatura. Os resultados da estabilidade térmica em relação aos pós obtidos de células secas com maltodextrina a 2% (m/v) e a combinação de maltodextrina a 2% (m/v) e TPP a 1% (m/v) e ressuspendidos, estão apresentados na Figura 3.5. Nessa Figura são apresentadas as atividades relativas ao longo do tempo de incubação nas temperaturas de 30, 35, 40 e 50°C, evidenciando o impacto significativo da temperatura na estabilidade.

Figura 3. 5- Resultados da estabilidade térmica das células de *K. marxianus* que expressam atividade de β -galactosidase seca com maltodextrina e maltodextrina com tripolifosfato de sódio por spray drying ao longo do tempo de incubação nas temperaturas de: a) 30, b) 35, c) 40 e d) 50°C.



Pode ser observado na Figura 3.5 (A) que a adição de TPP junto a maltodextrina e a célula aumentou a resistência térmica da enzima a 30°C por 24 horas, mantendo cerca de 75% da atividade inicial, enquanto a célula com maltodextrina isolada permitiu apenas 40% de retenção da atividade inicial. Na Figura 3.5 (B), a maltodextrina sozinha preservou melhor a atividade enzimática do que associada ao TPP. A adição de trifosfato de sódio leva a uma queda brusca da atividade logo nos primeiros 200 minutos, mantendo-se com atividade abaixo de 60% do valor inicial. Na Figura 3.5 (C), quando as amostras foram expostas a 40°C por 300 minutos, a perda de atividade foi mais rápida com a combinação de células, maltodextrina e TPP, sendo que a formulação apenas com o uso de células e maltodextrina manteve a atividade enzimática acima de 50% por volta de até 100 minutos, porém a enzima perdeu cerca de 75% da atividade em 300 minutos em ambas as formulações. Para a reação a 50°C por 30 minutos (Figura 3.5 (D)), nota-se uma perda de atividade abrupta em ambas as formulações, porém a formulação que apresenta a combinação de células, maltodextrina e trifosfato de sódio apresentou ligeira

vantagem nos primeiros 10 minutos, mas ambas convergiram para valores de atividade enzimática muito baixos (~10%) em 20 a 30 minutos.

De modo geral, a adição de TPP à formulação com maltodextrina não conferiu vantagem significativa em relação ao uso isolado da maltodextrina na maioria dos tratamentos térmicos. Como evidenciado na Figura 3.5 (C), a amostra contendo apenas maltodextrina manteve maior atividade enzimática ao longo do tempo em comparação àquela com a combinação de maltodextrina e TPP, quando submetidas a 40°C. Isso pode estar relacionado ao fato de que o TPP, apesar de suas propriedades estabilizantes, pode modificar o microambiente da enzima e comprometer a sua estrutura em condições térmicas mais elevadas.

Por outro lado, em temperaturas mais baixas, como 30°C e 35°C (Figuras 3.5 (A) e 3.5 (B)), observa-se que a formulação com TPP foi mais eficaz em manter a estabilidade enzimática ao longo do tempo, especialmente na fase final das curvas, indicando potencial vantagem em aplicações que envolvam armazenamento ou uso prolongado a temperaturas moderadas. Ou seja, para as aplicações industriais que envolvam estabilidade térmica em temperaturas até aproximadamente 35°C, a combinação de células com adição de maltodextrina e TPP se mostra promissora.

No trabalho de Ribeiro et al. (2024), ao analisar a β -galactosidase encapsulada em micropartículas formadas por maltodextrina, por proteínas isoladas de soja (PIS) e por apenas caldo fermentado, observou-se que a atividade enzimática foi reduzida de forma progressiva com o aumento da temperatura e do tempo de incubação. Quando a amostra foi submetida a 30°C, houve uma redução de aproximadamente 29% a 33% da atividade após 24 horas, sendo a formulação com maltodextrina a que apresentou maior perda, enquanto as micropartículas com PIS e com apenas célula sem material de parede apresentaram resultados similares ao final do tempo de incubação. Já a 35°C, a micropartícula com maltodextrina teve uma queda de 33%, a com PIS de 38% e a formada apenas por célula manteve cerca de 65% da atividade inicial após 12 horas. A 40°C, observou-se uma perda acentuada em todas as formulações (71% a 79% em 300 minutos), sendo a micropartícula com PIS a mais instável. Por último, a 50°C, todas as formulações apresentaram queda drástica na atividade enzimática já nos primeiros 15 minutos, com valores residuais próximos de 0,05 após 30 minutos, evidenciando rápida inativação térmica nesse nível de temperatura.

Os dados experimentais de atividade enzimática residual em função do tempo de incubação, obtidos para cada temperatura e tratamento, foram submetidos ao ajuste de modelos de desativação térmica, conforme metodologia descrita no item 3.2.6. Utilizou-se o software Statistica® 8.0, aplicando o método numérico de Levenberg-Marquardt, com o objetivo de

estimar os parâmetros cinéticos com base nos melhores ajustes (HENLEY; SADANA, 1985; MORÉ, 1978).

A seleção do modelo mais adequado foi baseada na combinação entre o maior valor do coeficiente de determinação (R^2) e o menor valor da soma dos quadrados dos desvios, garantindo, assim, a melhor representação do comportamento experimental. A partir dos resultados obtidos, verificou-se que o modelo cinético de desativação de primeira ordem (Equação 3.6) apresentou melhor desempenho para todas as temperaturas analisadas. Dessa forma, este modelo foi adotado para descrever a cinética de inativação térmica nos dois sistemas avaliados: célula com maltodextrina e célula com maltodextrina e TPP.

Na Tabela 3.3 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* seca por *spray drying* com adição de maltodextrina e maltodextrina e TPP.

Tabela 3.3- Ajuste dos dados experimentais ao modelo de desativação térmica de primeira ordem para β -galactosidase presente na célula de *K. marxianus* seca por *spray drying* com adição de maltodextrina e maltodextrina e tripolifosfato de sódio.

Tratamento	T (°C)	Kd (min ⁻¹)	Valor - p	R ²	$\Sigma(V - \bar{V})^2$
Células com adição de maltodextrina	30	0,000657	0,112237	0,99	0,00542059
Células com adição de maltodextrina	35	0,00350	0,0001964	0,95	0,057630693
Células com adição de maltodextrina	40	0,009980	0,013917	0,99	0,01510472
Células com adição de maltodextrina	50	0,382005	0,000351	0,99	0,00114794
Células com adição de maltodextrina e TPP	30	0,00062	0,026095	0,99	0,0001686
Células com adição de maltodextrina e TPP	35	0,005561	0,00	0,99	0,000541715
Células com adição de maltodextrina e TPP	40	0,027764	0,000234	0,99	0,00141753
Células com adição de maltodextrina e TPP	50	0,214456	0,000318	0,99	0,00257129

Todos os resultados obtidos foram significativos com nível de confiança de 90% e apresentaram coeficiente de determinação (R^2) superiores a 0,95 e os valores da soma do quadrado dos desvios foram inferiores a 0,069, desta forma o ajuste foi considerado

adequado. Foi observado que quanto menor a temperatura, menor foi o valor de k_d obtido, ou seja, maior a estabilidade da enzima, como era de se esperar. As equações de desativação térmica de primeira ordem obtidas a partir do ajuste do modelo estão dispostas na Tabela 3.4.

Tabela 3.4 - Equações de desativação térmica de primeira ordem

Tratamento	T (°C)	Equação de desativação térmica de primeira ordem
Células com adição de maltodextrina	30	$\frac{A}{AO} = e^{-0,000657 \times t}$
Células com adição de maltodextrina	35	$\frac{A}{AO} = e^{-0,0004 \times t}$
Células com adição de maltodextrina	40	$\frac{A}{AO} = e^{-0,009980 \times t}$
Células com adição de maltodextrina	50	$\frac{A}{AO} = e^{-0,382005 \times t}$
Células com adição de maltodextrina e TPP	30	$\frac{A}{AO} = e^{-0,00062 \times t}$
Células com adição de maltodextrina e TPP	35	$\frac{A}{AO} = e^{-0,005561 \times t}$
Células com adição de maltodextrina e TPP	40	$\frac{A}{AO} = e^{-0,027764 \times t}$
Células com adição de maltodextrina e TPP	50	$\frac{A}{AO} = e^{-0,214456 \times t}$

Por meio das constantes de desativação térmica (k_d) que foram ajustadas aos modelos de desativação que apresentaram o melhor ajuste, foi calculado os tempos de meia vida conforme a Equação 3.9 para cada temperatura e tratamento. Os resultados estão apresentados na Tabela 3.5.

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* seca por *spray drying*.

Tratamento	T (°C)	Kd (min ⁻¹)	R ²	t ½ (min)
Células com adição de maltodextrina	30	0,000657	0,99	1055,02
Células com adição de maltodextrina	35	0,00350	0,95	198,04
Células com adição de maltodextrina	40	0,009980	0,99	69,45
Células com adição de maltodextrina	50	0,382005	0,99	1,81
Células com adição de maltodextrina e TPP	30	0,00062	0,99	1117,98
Células com adição de maltodextrina e TPP	35	0,017000	0,99	124,44
Células com adição de maltodextrina e TPP	40	0,027764	0,99	24,97
Células com adição de maltodextrina e TPP	50	0,214456	0,99	3,23

A enzima incubada a 30°C apresentou o maior tempo de meia vida para o tratamento com a combinação de maltodextrina e trifosfato de sódio (1117,98 minutos), representando um aumento de 62,96 minutos em relação ao tratamento com apenas maltodextrina (1055,02 minutos). Embora a diferença entre os valores não seja muito expressiva, esse resultado pode estar associado ao longo tempo total de incubação adotado no experimento (1440 minutos), que pode ter favorecido processos de oxidação natural da enzima. Nesse cenário, a presença do trifosfato de sódio parece ter desempenhado um papel protetor, atuando como agente de reticulação e fortalecendo a estrutura da matriz ao redor das células, o que possivelmente reduziu a exposição da enzima a fatores degradativos ao longo do tempo.

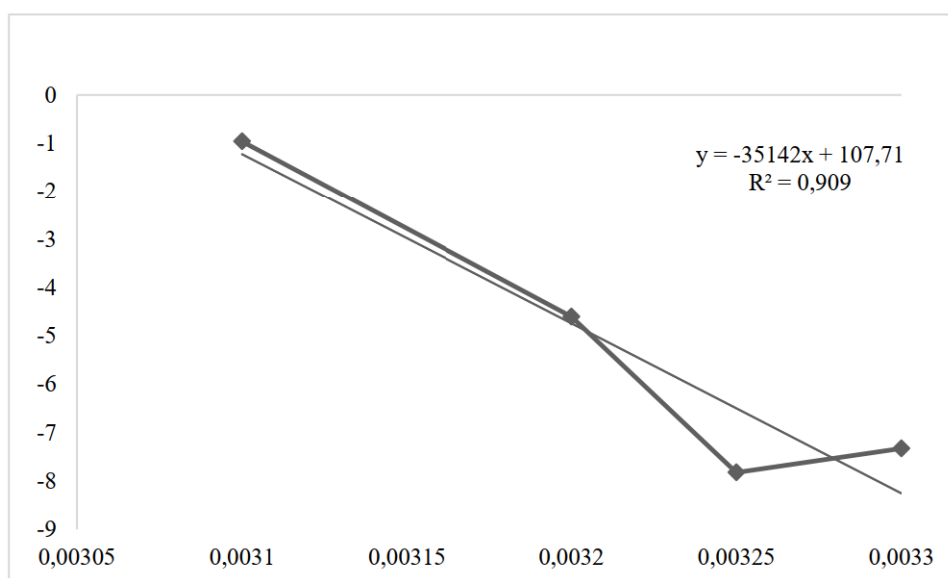
Em 35°C a célula com apenas maltodextrina apresentou maior tempo de meia vida (198,04 minutos), apresentando uma diferença de 73,6 minutos a mais que o tempo de meia vida da combinação de maltodextrina e trifosfato de sódio. Na temperatura de 40°C observou-se uma redução considerável da atividade enzimática, pois o tempo de meia-vida foi de 69,45 para a célula com maltodextrina e de 24,97 para a combinação de maltodextrina e trifosfato de sódio. E por último para a temperatura de 50°C a queda da atividade enzimática foi mais intensa em ambos os tratamentos, sendo o tempo de meia-vida de apenas de 3,23 minutos para a

amostra combinada de maltodextrina e trifosfato de sódio e de 1,31 minutos para aquelas que foram adicionada apenas maltodextrina.

Esses resultados indicam que o trifosfato de sódio pode ter desempenhado um papel importante na proteção e estabilização da enzima ao longo do tempo, especialmente em condições mais brandas, como a 30°C, onde a incubação se estendeu por 1440 minutos. Nessa situação, o trifosfato de sódio, ao atuar como agente reticulante, pode ter contribuído para uma estrutura mais estável, ajudando a minimizar os efeitos de possíveis reações oxidativas e, assim, preservando a atividade enzimática por mais tempo. Por outro lado, em temperaturas mais elevadas esse efeito estabilizante não foi observado com a mesma intensidade. Mesmo com tempos de exposição mais curtos, a ação do calor aparentemente acelerou progressivamente a degradação da enzima, superando a proteção oferecida pelo reticulante.

Com base na equação de Arrhenius na forma linearizada (Equação 3.10), utilizando o software Excel 2016, plotou-se os dados de $\ln(k_d)$ em função do inverso da temperatura (K). O coeficiente angular da regressão dos dados corresponde ao termo da equação de Arrhenius $-\frac{E_a}{R}$. Deste modo obteve-se a Figura 3.6 e a Equação 3.11 para a micropartícula formada com maltodextrina.

Figura 3.6 - Ajuste do modelo de Arrhenius (___) aos dados experimentais (valores de k_d) para micropartículas de células com maltodextrina



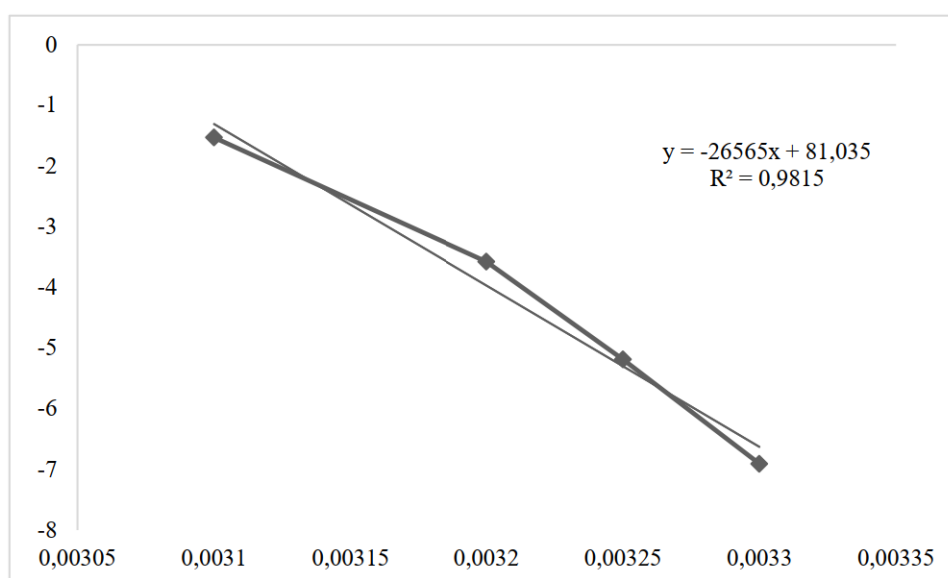
O ajuste linear ao modelo de Arrhenius apresentou um coeficiente de determinação de

0,91 e a energia de ativação (E_a) calculada foi de 69,83 kcal/mol. A Equação 3.11 e a Figura 3.6 foram obtidas após o ajuste do modelo de Arrhenius aos dados experimentais (valores de k_d) da célula de *K. marxianus* seca com maltodextrina.

$$\ln(k_d) = -35142 \cdot \frac{1}{T} + 107,71 \quad (3.11)$$

O ajuste linear ao modelo de Arrhenius apresentou um coeficiente de determinação de 0,98 e a E_a calculada foi de 52,78 kcal/mol. A Equação 3.12 e a Figura 3.7 foram obtidas após o ajuste ao modelo de Arrhenius para a célula de *K. marxianus* seca com maltodextrina e TPP.

Figura 3.7 - Ajuste ao modelo de Arrhenius (—) aos dados experimentais (valores de k_d) para micropartículas de células com maltodextrina e TPP.



$$\ln(k_d) = -26565 \cdot \frac{1}{T} + 81,035 \quad (3.12)$$

Sousa et al. (2021) avaliaram a estabilidade térmica da enzima β -galactosidase solúvel obtida de *K. marxianus* em temperatura de 30°C e verificaram um tempo de meia vida de 3387,0 minutos e E_a calculada de 64,13 kcal/mol.

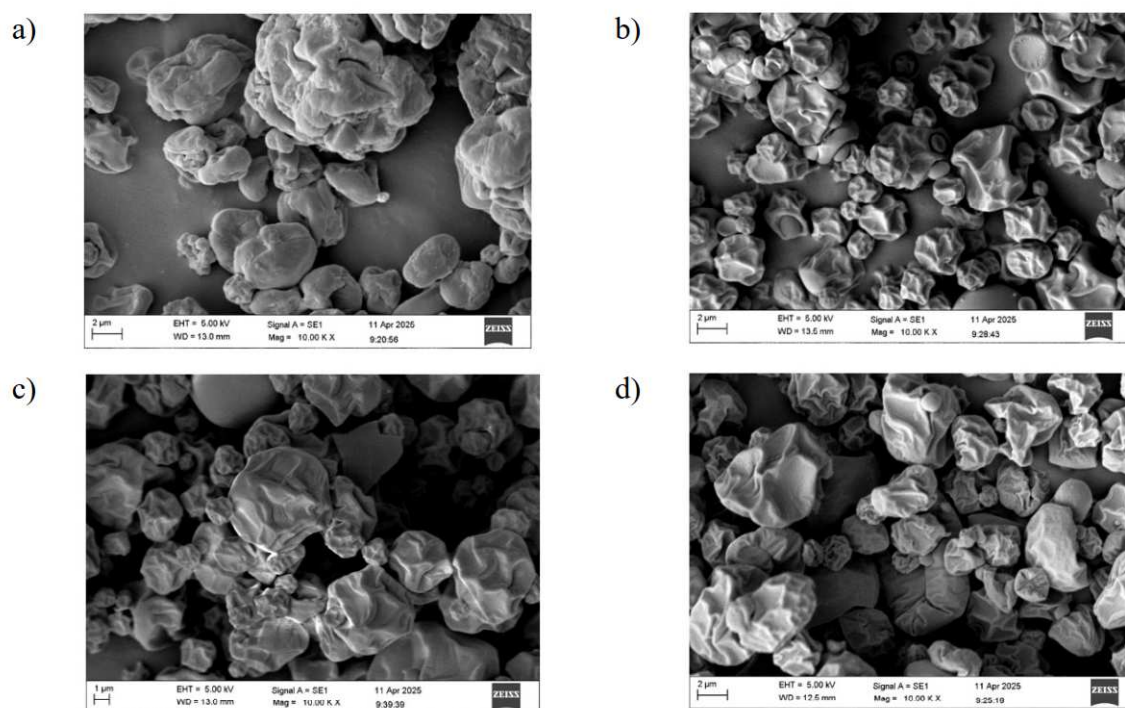
Ribeiro et al. (2024), ao avaliarem a estabilidade térmica a 30°C de uma célula de *K. marxianus* que expressa atividade de β -galactosidase microencapsulada em *spray dryer* também encontraram valores próximos, sendo o tempo de meia vida (min) de 2831,8; 3446,5 e 2637,2 kcal/mol e E_a iguais a 59,61; 62,22; e 56,25 kcal/mol para células microencapsuladas com maltodextrina, PIS e célula sem material de parede, respectivamente. A amostra contendo

apenas maltodextrina apresentou uma energia de ativação mais elevada (69,83 kcal/mol), indicando maior resistência à degradação térmica em comparação à formulação com a combinação de maltodextrina e TPP, cuja E_a foi de 52,78 kcal/mol. Esse resultado sugere que, sob aumento de temperatura, a presença do TPP não conferiu proteção térmica superior, o que também foi observado experimentalmente (Figuras 3.5). Portanto, embora a formulação com maltodextrina isolada tenha demonstrado maior estabilidade térmica, a combinação com trifosfato de sódio pode ter oferecido proteção adicional ao longo do tempo, especialmente em temperaturas mais baixas, contribuindo para a preservação da atividade enzimática frente a danos oxidativos.

3.3.4 Avaliação morfológica das células de *K. marxianus* seca por *spray drying*

A análise morfológica é fundamental para compreender a influência da maltodextrina, TPP e sua combinação na estrutura do pó formado pela secagem da célula por pulverização a 120°C, bem como seu potencial de proteção à célula com expressão da atividade de β -galactosidase. Na Figura 3.8, pode ser observado os resultados da análise da microestrutura da célula sem agente carreador.

Figura 3.8 – a) Microscopias eletrônicas de varredura: a) célula sem agente carreador; b) célula com adição de maltodextrina; c) célula com adição de maltodextrina e tripolifosfato de sódio e d) célula e tripolifosfato de sódio, com aumento (amplificação) de 10.000 vezes.



De forma geral, as micrografias obtidas revelaram variações na rugosidade superficial, forma, presença de fissuras e uniformidade das partículas, refletindo o papel de cada componente na estabilidade física da matriz. A micrografia referente ao caldo fermentado seco sem adição de agente carreador e reticulante foi amplificada 10000 vezes, intensidade do feixe (EHT) 5.00 kV e distância entre a amostra e a lente (WD) igual a 13 mm. A microscopia referente a essa amostra mostrou partículas com morfologia variando de esférica a irregular, superfície rugosa, colapsada, com estruturas visivelmente encolhidas e deformadas. Essa morfologia indica instabilidade estrutural, provavelmente decorrente da ausência de material formador de matriz, o que compromete a proteção das células durante a secagem. Tais características podem favorecer a oxidação e a degradação da enzima durante o armazenamento, como demonstrado no item 3.3.2, na qual se observou perda total da atividade residual ao final de 120 dias em temperatura ambiente (25°C).

Na amostra contendo maltodextrina (Figura 3.8(B)), as partículas apresentaram morfologia predominantemente esférica e contornos mais definidos em relação à amostra anterior. A superfície manteve certa rugosidade, porém com colapso mais controlado — típico de formulações com agentes carreadores. A presença da maltodextrina conferiu maior uniformidade de tamanho e forma, favorecendo a formação de uma matriz protetora mais eficiente. A imagem dessa amostra foi amplificada 10000 vezes, com intensidade do feixe (EHT) de 5.00 kV e distância entre a amostra e a lente (WD) igual a 13,5 mm.

A amostra com a combinação de maltodextrina e TPP (Figura 3.8(C)) apresentou partículas com morfologia esférica, contornos bem definidos e superfície suavemente enrugada, mas mais compacta e estruturada do que nos demais tratamentos. Notou-se a presença de partículas maiores e com superfície mais lisa, possivelmente indicando a formação de microcápsulas com múltiplas camadas. Essa estrutura reforçada pode ser atribuída à reticulação promovida pelo TPP associada à formação da matriz vítrea da maltodextrina, resultando em maior estabilidade e proteção à enzima durante o armazenamento. Essa amostra foi analisada com a imagem amplificada em 10000 vezes, intensidade do feixe (EHT) de 5.00 kV e distância entre a amostra e a lente (WD) igual de 13,5 mm.

Por fim, a micrografia da amostra com TPP isolado (Figura 3.8(D)) revelou partículas predominantemente irregulares e colapsadas, com invaginações profundas e contornos pouco definidos. A superfície rugosa e o aspecto achatado de algumas partículas sugerem baixa resistência à retração durante a secagem. Embora o TPP atue como agente reticulante, sua aplicação isolada não foi suficiente para formar partículas com morfologia estável, o que pode comprometer a proteção da enzima frente a fatores ambientais. A imagem dessa amostra foi

amplificada 10000 vezes, com intensidade do feixe (EHT) de 5.00 kV e distância entre a amostra e a lente (WD) igual de 12,5 mm.

Esses resultados são coerentes com o estudo de Ribeiro et al. (2024), que observaram diferenças morfológicas significativas na microencapsulação de *K. marxianus* por spray drying utilizando diferentes materiais de parede. No referido estudo, células encapsuladas com alginato de sódio apresentaram partículas predominantemente esféricas, com algumas alongadas e superfície mais lisa em comparação àquelas produzidas com goma arábica ou maltodextrina. A heterogeneidade no tamanho das partículas foi atribuída à presença de múltiplas células encapsuladas em uma mesma micropartícula, fenômeno também observado, em menor grau, nos sistemas com maltodextrina.

Resultados semelhantes também foram relatados por (BARAJAS-ÁLVAREZ; GONZÁLEZ-ÁVILA; ESPINOSA-ANDREWS, 2022) em um estudo com células de *Lactobacillus rhamnosus* secas por spray drying. As micrografias revelaram partículas esféricas com concavidades características do processo, ausência de fraturas superficiais e evidência de formação de filme ao redor das células, sugerindo boa proteção estrutural dos probióticos, à semelhança do que foi observado neste trabalho com a combinação de maltodextrina e TPP.

No estudo de Busto et al. (2022), a microencapsulação da enzima Flavourzyme® por *spray drying* em quitosana reticulada com TPP apresentou semelhança com a presente pesquisa ao analisar morfologia do produto seco com uso do TPP, ao apresentar partículas predominantemente esféricas, mas com superfícies claramente mais rugosas e sulcos profundos em comparação às partículas não reticuladas. Esses achados reforçam a hipótese de que o uso de TPP na secagem por *spray drying* gera alterações morfológicas detectáveis por MEV que podem estar diretamente relacionadas à proteção da enzima.

Desai; Park, (2005) investigaram o efeito de diferentes agentes de reticulação nas microesferas de quitosana, sendo eles o tripolifosfato (TPP), formaldeído (FA) e glutaraldeído (GA), por *spray drying*. As micropartículas de quitosana apresentaram diferenças morfológicas significativas conforme o agente reticulante utilizado. Para as amostras reticuladas com TPP foi observado partículas predominantemente esféricas com rugosidade acentuada e sulcos profundos. O TPP se mostrou o agente reticulante mais eficaz, gerando micropartículas de quitosana com alta eficiência de encapsulação (até 99,17%). Esses resultados se correlacionam com o presente estudo, onde o uso de TPP também levou a alterações morfológicas e à melhor estabilidade em reações em temperatura amenas (até 35°C) ao longo do tempo e sua combinação com maltodextrina ofereceu vantagens no seu uso em temperaturas superiores e na estabilidade ao armazenamento da célula que expressa atividade de β -galactosidase.

4. CONCLUSÃO

Neste estudo, objetivou-se estudar o processo de secagem por *spray drying* da β -galactosidase intracelular produzida por *Kluyveromyces marxianus* com foco na preservação da atividade enzimática e na estabilidade do produto final. Inicialmente, investigou-se o efeito de diferentes temperaturas e da adição de maltodextrina sobre a atividade enzimática e as propriedades físico-químicas do pó obtido. Entre as condições testadas, a secagem a 120°C com adição de 2% de maltodextrina resultou nos melhores resultados de atividade enzimática e recuperação (447,71 $\mu\text{mol/min}$), apresentando umidade de 3,02%, atividade de água de 0,21, solubilidade de 82,63%, higroscopicidade de 16,4 g/100ms e rendimento de 62%.

A partir desses resultados, a investigação foi aprofundada para avaliar o efeito da combinação de maltodextrina com TPP como estratégia para melhorar a estabilidade da enzima durante o armazenamento, em temperatura ambiente e sob refrigeração, por até 120 dias. Assim, os resultados demonstraram que a combinação do agente carreador (maltodextrina) com o agente reticulante (TPP) para a secagem das células de *Kluyveromyces marxianus* que expressam β -galactosidase foi a condição que trouxe melhor estabilidade para a enzima desempenhar sua atividade enzimática durante o armazenamento, tanto refrigerada quanto na temperatura ambiente. Embora para todas as formulações, o armazenamento sob temperatura de refrigeração preservou melhor a atividade enzimática.

A caracterização morfológica por MEV nas amostras com TPP e maltodextrina revelou partículas predominantemente esféricas e com superfície relativamente lisa, características desejáveis que indicam boa estabilidade e proteção da célula. Por outro lado, as amostras secas com maltodextrina isoladamente apresentaram maior atividade enzimática em temperaturas reacionais a partir de 35°C, indicando que essa formulação pode ser mais adequada para aplicações em processos térmicos mais elevados.

Por fim, a secagem por *spray drying* de células expressando β -galactosidase de *K. marxianus* é uma estratégia viável e eficiente, capaz de gerar um produto com atividade enzimática preservada, estabilidade térmica e ao armazenamento, e propriedades físico-químicas adequadas para aplicações industriais. A combinação de maltodextrina e TPP se mostrou-se promissora, permitindo modular as características do produto final conforme as exigências da aplicação pretendida.

PROPOSTA PARA TRABALHOS FUTUROS

- Avaliação da temperatura do pó enzimático ao atingir o coletor do spray dryer e sua interferência na atividade enzimática;
- Avaliação de diferentes métodos de secagem na condição otimizada com o agente reticulante;
- Avaliação da liberação enzimática em condições simuladas de uso alimentar.

3 REFERÊNCIAS

AZHAR, Mohammad Danial *et al.* Development of carrier material for food applications in spray drying technology: An overview. *In: Elsevier Ltd*, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2021.04.140>.

BANO, Saeeda *et al.* Purification and characterization of β -galactosidase from *Aspergillus fumigatus* PCSIR-2013. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 34, n. 4, p. 1333–1340, 1 jul. 2021.

BARAJAS-ÁLVAREZ, Paloma; GONZÁLEZ-ÁVILA, Marisela; ESPINOSA-ANDREWS, Hugo. Microencapsulation of *Lactobacillus rhamnosus* HN001 by spray drying and its evaluation under gastrointestinal and storage conditions. **LWT**, v. 153, 1 jan. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112485>.

BELLAOUCHI, Reda *et al.* Characterization and optimization of extracellular enzymes production by *Aspergillus niger* strains isolated from date by-products. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 19, n. 1, 1 dez. 2021. <https://doi.org/10.1186/s43141-021-00145-y>.

BILAL, Muhammad *et al.* Bioprospecting *Kluyveromyces marxianus* as a Robust Host for Industrial Biotechnology. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 10, 20 abr. 2022. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.851768>.

BRAGA, Alinne B. A. C. *et al.* braga et al 2019. **Powder Technology**, p. 199–206, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2019.02.037>.

BRANCHU, Sébastien *et al.* Hydroxypropyl- β -cyclodextrin inhibits spray-drying-induced inactivation of β -galactosidase. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 88, n. 9, p. 905–911, 1999. <https://doi.org/10.1021/js9804819>.

BÜRKI, K. *et al.* New insights into respirable protein powder preparation using a nano spray dryer. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 408, n. 1–2, p. 248–256, abr. 2011. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.02.012>.

BUSTO, María D. *et al.* Microencapsulation of a Commercial Food-Grade Protease by Spray Drying in Cross-Linked Chitosan Particles. **Foods**, v. 11, n. 14, 1 jul. 2022. <https://doi.org/10.3390/foods11142077>.

CAI, Y. Z.; CORKE, H. Production and Properties of Spray-dried *Amaranthus* Betacyanin Pigments. **1248 JOURNAL OF FOOD SCIENCE**, v. 65, n. 6, 2000. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2000.tb10273.x>.

CAO-CHAUCA, Milton *et al.* Effect of the carriers on the microstructure of mango powder obtained by spray drying and its functional characterization. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 6, n. 4, p. 420–428, 1 dez. 2005. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2005.05.003>.

CAVALCANTI, Rayza Morganna Farias *et al.* Stabilization and application of spray-dried tannase from *Aspergillus fumigatus* CAS21 in the presence of different carriers. **3 Biotech**, v. 10, n. 4, 1 abr. 2020. <https://doi.org/10.1007/s13205-020-2164-z>.

CHEN, Yuqiu; LIANG, Xiaodong; KONTOGEORGIS, Georgios M. Optimal Design of Aqueous Two-Phase Systems for Biomolecule Partitioning. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 62, n. 28, p. 11165–11177, 19 jul. 2023. <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.3c00710>.

DANTAS, Denise *et al.* Influence of spray drying conditions on the properties of avocado powder drink. **Food Chemistry**, v. 266, p. 284–291, 15 nov. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.06.016>.

DE CARVALHO, Catherine T. *et al.* Recovery of β -galactosidase produced by *Kluyveromyces lactis* by ion-exchange chromatography: Influence of pH and ionic strength parameters. **Anais da Academia Brasileira de Ciencias**, v. 94, n. 1, 2022. <https://doi.org/10.1590/0001-3765202220200752>.

DE SOUSA, Carla Cristina *et al.* Synthesis and Immobilization of β -galactosidase from *Kluyveromyces marxianus* Using Ion Exchange Resin. **Industrial Biotechnology**, v. 17, n. 1, p. 27–37, 1 fev. 2021. <https://doi.org/10.1089/ind.2020.0007>.

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**, v. 22, n. 4, p. 377–395, jun. 2005. <https://doi.org/10.1080/02652040500100139>.

DESCAMPS, Nicolas *et al.* Glass transition and flowability/caking behaviour of maltodextrin de 21. **Journal of Food Engineering**, v. 119, n. 4, p. 809–813, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.06.045>.

DI SANTO, Mariana Carolina *et al.* **Chitosan-tripolyphosphate nanoparticles designed to encapsulate polyphenolic compounds for biomedical and pharmaceutical applications – A review**. **Biomedicine and Pharmacotherapy** Elsevier Masson s.r.l., 1 out. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111970>.

DÍAZ VERGARA, Ladislao I. *et al.* Chitosan-glucose derivative as effective wall material for probiotic yeasts microencapsulation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 253, 31 dez. 2023. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.127167>.

EBERSBACH, Hilmar; GEISSE, Sabine. Antigen generation and display in therapeutic antibody drug discovery - a neglected but critical player. **Biotechnology Journal**, v. 7, n. 12, p. 1433–1443, dez. 2012. <https://doi.org/10.1002/biot.201200066>.

EL-GINDY, A. Production, Partial Purification and Some Properties of β -Galactosidase from *Aspergillus carbonarius*. **Folia Microbiol**, v. 48, n. 5, p. 581–584, 2003. <https://doi.org/10.1007/BF02993462>.

ESTEVINHO, Berta N. *et al.* Microencapsulation of β -galactosidase with different biopolymers by a spray-drying process. **Food Research International**, v. 64, p. 134–140, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.05.057>.

ESTEVINHO, Berta N.; RAMOS, Irena; ROCHA, Fernando. Effect of the pH in the formation of β -galactosidase microparticles produced by a spray-drying process. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 78, p. 238–242, 1 jul. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.03.049>.

FERNANDES, S. *et al.* β -Galactosidase from a cold-adapted bacterium: Purification, characterization and application for lactose hydrolysis. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 58, n. 3, p. 313–321, 2002. <https://doi.org/10.1007/s00253-001-0905-4>.

FERREIRA ROSA, Paula Rúbia; SANTOS, Samantha Christine; SILVA, Edson Luiz. Different ratios of carbon sources in the fermentation of cheese whey and glucose as substrates for hydrogen and ethanol production in continuous reactors. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 39, n. 3, p. 1288–1296, 16 jan. 2014. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2013.11.011>.

GABARDO, Sabrina *et al.* Dynamics of ethanol production from whey and whey permeate by immobilized strains of *Kluyveromyces marxianus* in batch and continuous bioreactors. **Renewable Energy**, v. 69, p. 89–96, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2014.03.023>.

GENNARI, Adriano *et al.* Recombinant production in *Escherichia coli* of a β -galactosidase fused to a cellulose-binding domain using low-cost inducers in fed-batch cultivation. **Process Biochemistry**, v. 124, p. 290–298, 1 jan. 2023. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2022.11.024>.

GHANDI, Amir *et al.* The Effect of Dryer Inlet and Outlet Air Temperatures and Protectant Solids on the Survival of *Lactococcus lactis* during Spray Drying. **Drying Technology**, v. 30, n. 14, p. 1649–1657, nov. 2012. <https://doi.org/10.1080/07373937.2012.703743>.

GHARSALLAOUI, Adem *et al.* Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. **Food Research International**, nov. 2007. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2007.07.004>.

GOULA, Athanasia M.; ADAMOPOULOS, Konstantinos G. Effect of maltodextrin addition during spray drying of tomato pulp in dehumidified air: II. powder properties. **Drying Technology**, v. 26, n. 6, p. 726–737, jun. 2008. <https://doi.org/10.1080/07373930802046377>.

GUPTA, Gupteshwar *et al.* Spray-drying of xylanase from thermophilic fungus *Melanocarpus albomyces*-Effect of carriers and binders on enzyme stability. **Indian Journal of Chemical Technology**, v. 21, p. 89–95, 2014.

HARINARAYAN, C. *et al.* An exclusion mechanism in ion exchange chromatography. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 95, n. 5, p. 775–787, 5 dez. 2006. <https://doi.org/10.1002/bit.21080>.

HELJO, Ville Petteri *et al.* The use of disaccharides in inhibiting enzymatic activity loss and secondary structure changes in freeze-dried β -galactosidase during storage. **Pharmaceutical Research**, v. 28, n. 3, p. 540–552, mar. 2011. <https://doi.org/10.1007/s11095-010-0300-x>.

HUNG, M. N.; LEE, B. Purification and characterization of a recombinant β -galactosidase with transgalactosylation activity from *Bifidobacterium infantis* HL96. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 58, n. 4, p. 439–445, 2002. <https://doi.org/10.1007/s00253-001-0911-6>.

JAFARI, Seid Mahdi; GHALEGI GHALENOEI, Malihe; DEHNAD, Danial. Influence of spray drying on water solubility index, apparent density, and anthocyanin content of pomegranate juice powder. **Powder Technology**, v. 311, p. 59–65, 15 abr. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2017.01.070>.

JUAJUN, Onladda *et al.* Cloning, purification, and characterization of β -galactosidase from *Bacillus licheniformis* DSM 13. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 89, n. 3, p. 645–654, fev. 2011. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2862-2>.

KAUR, Rupinder; PANWAR, Divyani; PANESAR, Parmjit S. Biotechnological approach for valorization of whey for value-added products. **Food Industry Wastes: Assessment and Recuperation of Commodities**, p. 275–302, 1 jan. 2020. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817121-9.00013-9>.

KHAYATI, Gholam; ANVARI, Masumeh; SHAHIDI, Nushin. Partitioning of β -galactosidase in aqueous two-phase systems containing polyethyleneglycol and phosphate salts. **Fluid Phase Equilibria**, v. 385, p. 147–152, 5 jan. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.fluid.2014.11.003>.

KOUSHKI, Mohammadreza; JAFARI, Mojtaba; AZIZI, Mohammadhosein. Comparison of ethanol production from cheese whey permeate by two yeast strains. **Journal of Food Science and Technology**, v. 49, n. 5, p. 614–619, out. 2012. <https://doi.org/10.1007/s13197-011-0309-0>.

LAKSHMI, B. K. M.; MUNI KUMAR, D.; HEMALATHA, K. P. J. Purification and characterization of alkaline protease with novel properties from *Bacillus cereus* strain S8. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 16, n. 2, p. 295–304, 1 dez. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2018.05.009>.

LAVARI, Luisina *et al.* Growth of *Lactobacillus rhamnosus* 64 in whey permeate and study of the effect of mild stresses on survival to spray drying. **LWT**, v. 63, n. 1, p. 322–330, 1 set. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.03.066>.

LEMES, Ailton C. *et al.* Design strategies for integrated β -galactosidase purification processes. **Chemical Engineering and Technology**, v. 37, n. 10, p. 1805–1812, 1 out. 2014. <https://doi.org/10.1002/ceat.201300433>.

LIENQUEO, M. Elena *et al.* Current insights on protein behaviour in hydrophobic interaction chromatography. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the**

Biomedical and Life Sciences, v. 849, n. 1–2, p. 53–68, 15 abr. 2007. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2006.11.019>.

LIPIÄINEN, Tiina *et al.* Comparison of melibiose and trehalose as stabilising excipients for spray-dried β -galactosidase formulations. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 543, n. 1–2, p. 21–28, 30 maio 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.03.035>.

LIU, Dong Mei; CHEN, Juan; SHI, Yan Ping. **Advances on methods and easy separated support materials for enzymes immobilization**. TrAC - Trends in Analytical Chemistry, v. 102, p. 332–342, 1 maio 2018. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.03.011>.

LOPES, Ana R. *et al.* Production of microparticles of molinate degrading biocatalysts using the spray drying technique. **Chemosphere**, v. 161, p. 61–68, 1 out. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.07.006>.

MAJORE, Kristine; CIPROVICA, Inga. Sensory Assessment of Bi-Enzymatic-Treated Glucose-Galactose Syrup. **Fermentation**, v. 9, n. 2, 1 fev. 2023. <https://doi.org/10.3390/fermentation9020136>.

MANO, Mario Cezar Rodrigues; PAULINO, Bruno Nicolau; PASTORE, Gláucia Maria. Whey permeate as the raw material in galacto-oligosaccharide synthesis using commercial enzymes. **Food Research International**, v. 124, p. 78–85, 1 out. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.09.019>.

MANZANARES, Paloma; DE GRAAFF, Leo H.; VISSER, Jaap. Characterization of galactosidases from *Aspergillus niger*: purification of a novel-galactosidase activity. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 22, p. 383–390, 1998. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(97\)00207-X](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(97)00207-X).

MARTARELLO, Raquel Dall'Agnol *et al.* Optimization and partial purification of beta-galactosidase production by *Aspergillus niger* isolated from Brazilian soils using soybean residue. **AMB Express**, v. 9, n. 1, 1 dez. 2019. <https://doi.org/10.1186/s13568-019-0805-6>.

MARTINS, E. *et al.* Determination of ideal water activity and powder temperature after spray drying to reduce *Lactococcus lactis* cell viability loss. **Journal of Dairy Science**, v. 102, n. 7, p. 6013–6022, 1 jul. 2019. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-16297>.

MEGHWANSHI, Gautam Kumar *et al.* Enzymes for pharmaceutical and therapeutic applications. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 67, n. 4, p. 586–601, 1 jul. 2020. <https://doi.org/10.1002/bab.1919>.

MOEJES, S. N. *et al.* Closed-loop spray drying solutions for energy efficient powder production. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 47, p. 24–37, 1 jun. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2018.01.005>.

MOHAMAD, Nur Royhaila *et al.* **An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes**. Biotechnology and Biotechnological Equipment, v. 29, n. 2, p. 205–220, 2015. <https://doi.org/10.1080/13102818.2015.1008192>.

MOHTAR, Nur Syazwani *et al.* Spray-dried immobilized lipase from *Geobacillus* sp. strain ARM in sago. **PeerJ**, v. 2019, n. 5, 2019. <https://doi.org/10.7717/peerj.6880>.

MOVAHEDPOUR, Ahmad *et al.* β -Galactosidase: From its source and applications to its recombinant form. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 69, n. 2, p. 612–628, 1 abr. 2022. <https://doi.org/10.1002/bab.2137>.

MUKUNDAN, Soumya *et al.* Enhancement in β -galactosidase activity of *Streptococcus lactis* cells by entrapping in microcapsules comprising of correlated silica nanoparticles. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 195, 1 nov. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2020.111245>.

NADAR, Shamraja S.; PAWAR, Rohini G.; RATHOD, Virendra K. Recent advances in enzyme extraction strategies: A comprehensive review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 101, p. 931–957, 1 ago. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.03.055>.

NAGY, Zoltán *et al.* β -galactosidase of *Penicillium chrysogenum*: Production, purification, and characterization of the enzyme. **Protein Expression and Purification**, v. 21, n. 1, p. 24–29, 2001. <https://doi.org/10.1006/prep.2000.1344>.

NARAHARI, C. R. *et al.* Purification of recombinant green fluorescent protein using chromatofocusing with a pH gradient composed of multiple stepwise fronts. **Biotechnology Progress**, v. 17, n. 1, p. 150–160, 1 jan. 2001. <https://doi.org/10.1021/bp0001415>.

NEWTON, Matilda S. *et al.* Enzyme evolution: innovation is easy, optimization is complicated. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 48, p. 110–116, 1 fev. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2017.11.007>.

NGUYEN, Thu Ha *et al.* Purification and characterization of two novel β -galactosidases from *Lactobacillus reuteri*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 14, p. 4989–4998, 12 jul. 2006. <https://doi.org/10.1021/jf053126u>.

NGUYEN, Vuong D. *et al.* Immobilization of β -galactosidase on chitosan-coated magnetic nanoparticles and its application for synthesis of lactulose-based galactooligosaccharides. **Process Biochemistry**, v. 84, p. 30–38, 1 set. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.05.021>.

NUMANOĞLU, Yasemin; SUNGUR, Sibel. β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* cell disruption and enzyme immobilization using a cellulose-gelatin carrier system. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 6, p. 705–711, 25 fev. 2004. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(03\)00183-3](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(03)00183-3).

O'CONNELL, S.; WALSH, G. Application relevant studies of fungal β -galactosidases with potential application in the alleviation of lactose intolerance. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 149, n. 2, p. 129–138, maio 2008. <https://doi.org/10.1007/s12010-007-8098-7>.

PANESAR, Parmjit S. *et al.* Microbial production, immobilization and applications of β -D-galactosidase. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 81, n. 4, p. 530–543, abr. 2006. <https://doi.org/10.1002/jctb.1453>.

PANESAR, Parmjit S. *et al.* Bioutilisation of whey for lactic acid production. **Food Chemistry**, v. 105, n. 1, p. 1–14, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.03.035>.

PARASHAR, Archana *et al.* Incorporation of whey permeate, a dairy effluent, in ethanol fermentation to provide a zero waste solution for the dairy industry. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 3, p. 1859–1867, 1 mar. 2016. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10059>.

PINHEIRO, R.; BELO, I.; MOTA, M. Growth and β -galactosidase activity in cultures of *Kluyveromyces marxianus* under increased air pressure. **Letters in Applied Microbiology**, v. 37, n. 6, p. 438–442, 2003. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.2003.01429.x>.

QIU, Yibin *et al.* *Kluyveromyces* as promising yeast cell factories for industrial bioproduction: From bio-functional design to applications. **Biotechnology Advances**, v. 64, 1 maio 2023. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2023.108125>.

QURESHI, N.; FRIEDL, A.; MADDOX, I. S. Butanol production from concentrated lactose/whey permeate: Use of pervaporation membrane to recover and concentrate product. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 23, p. 9859–9867, 15 nov. 2014. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6117-5>.

RABIEI, Samira *et al.* Consumption of milk and dairy products in Iranian population; barriers and facilitators. **Clinical Nutrition Open Science**, v. 38, p. 1–23, ago. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.nutos.2021.05.002>.

REDDY, Kanchi Bhasker Praveen Kumar; MADHU, Arenahalli Ningegowda; PRAPULLA, Siddalingaiya Gurudutt. Comparative survival and evaluation of functional probiotic properties of spray-dried lactic acid bacteria: ORIGINAL RESEARCH. **International Journal of Dairy Technology**, v. 62, n. 2, p. 240–248, maio 2009. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2009.00480.x>.

RIBEIRO, Adrielle Aparecida Paulista *et al.* An Approach for Using Non-purified β -Galactosidase: The Potential of β -Galactosidase in *Kluyveromyces marxianus* Cell Microparticles with Different Wall Materials. **Food and Bioprocess Technology**, 2024. <https://doi.org/10.1007/s11947-024-03427-8>.

RISNER, Derrick *et al.* The potential production of the bioactive compound pinene using whey permeate. **Processes**, v. 8, n. 3, 1 mar. 2020. <https://doi.org/10.3390/pr8030263>.

SAMANTHA, Serra Costa *et al.* Drying by spray drying in the food industry: Micro-encapsulation, process parameters and main carriers used. **African Journal of Food Science**, v. 9, n. 9, p. 462–470, 30 set. 2015. <https://doi.org/10.5897/AJFS2015.1279>.

SANTIAGO, Patrícia A.; MARQUEZ, Líbia D. S.; CARDOSO, Vicelma L.; RIBEIRO, Eloízio J. ESTUDO DA PRODUÇÃO DE β -GALACTOSIDASE POR FERMENTAÇÃO DE SORO DE QUEIJO COM *Kluyveromyces marxianus*. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 24, n. 4, p. 567–572, 2004. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612004000400015>.

SAQIB, Shaima *et al.* Sources of β -galactosidase and its applications in food industry. **3 Biotech**, v. 7, n. 1, 1 maio 2017. <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0645-5>.

SATO, Vanessa Sayuri *et al.* Phytase Production by *Rhizopus microsporus* var. *microsporus* Biofilm: Characterization of Enzymatic Activity After Spray Drying in Presence of Carbohydrates and Nonconventional Adjuvants. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, n. 2, p. 177–187, 28 fev. 2014. <https://doi.org/10.4014/jmb.1308.08087>.

SHI, Xin *et al.* Engineering the optimum pH of β -galactosidase from *Aspergillus oryzae* for efficient hydrolysis of lactose. **Journal of Dairy Science**, v. 105, n. 6, p. 4772–4782, 1 jun. 2022. <https://doi.org/10.3168/jds.2021-21760>.

SILVA, Eric Keven *et al.* Non-thermal microbial inactivation by using supercritical carbon dioxide: Synergic effect of process parameters. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 139, p. 97–104, 1 set. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2018.05.013>.

SINGH, Rahul Vikram; SAMBYAL, Krishika. β -galactosidase as an industrial enzyme: production and potential. **Chemical Papers**, v. 77, n. 1, p. 11–31, 1 jan. 2023. <https://doi.org/10.1007/s11696-022-02507-3>.

SRIVASTAVA, Gopal *et al.* Tartrate/tripolyphosphate as co-crosslinker for water soluble chitosan used in protein antigens encapsulation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 91, p. 381–393, 1 out. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.05.099>.

SURESH, Gayatri *et al.* Production and in-vitro evaluation of an enzyme formulation as a potential alternative to feed antibiotics in poultry. **Process Biochemistry**, v. 80, p. 9–16, 1 maio 2019. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.01.023>.

SZILAGYI, Andrew; ISHAYEK, Norma. Lactose Intolerance, Dairy Avoidance, and Treatment Options. **Nutrients**, v. 10, n. 12, p. 1994, 15 dez. 2018. <https://doi.org/10.3390/nu10121994>.

SZUDERA-KONCZAL, Kamila *et al.* The Use of Sour and Sweet Whey in Producing Compositions with Pleasant Aromas Using the Mold *Galactomyces geotrichum*: Identification of key odorants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 68, n. 39, p. 10799–10807, 30 set. 2020. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c03979>.

TOMMASO, Giovana *et al.* Production of Lipase from *Candida rugosa* Using Cheese Whey through Experimental Design and Surface Response Methodology. **Food and Bioprocess Technology**, v. 4, n. 8, p. 1473–1481, nov. 2011. <https://doi.org/10.1007/s11947-010-0432-3>.

VASILJEVIC, T.; JELEN, Paul. Retention of β -galactosidase activity in crude cellular extracts from *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* 11842 upon drying. **International Journal of Dairy Technology**, v. 56, n. 2, p. 111–116, maio 2003. <https://doi.org/10.1046/j.1471-0307.2003.00090.x>.

WANG, Huan *et al.* Effect of the condition of spray-drying on the properties of the polypeptide-rich powders from enzyme-assisted aqueous extraction processing. **Drying Technology**, v. 37, n. 16, p. 2105–2115, 10 dez. 2019. <https://doi.org/10.1080/07373937.2018.1563104>.

WEN, Peng *et al.* **Electrospinning: A novel nano-encapsulation approach for bioactive compounds**. **Trends in Food Science and Technology** Elsevier Ltd, 1 dez. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.10.009>.

WILKOWSKA, Agnieszka *et al.* Growth and by-product profiles of *Kluyveromyces marxianus* cells immobilized in foamed alginate. **Yeast**, v. 32, n. 1, p. 217–225, 1 jan. 2015. <https://doi.org/10.1002/yea.3044>.

WU, Yuanbing *et al.* **Chitosan-Based drug delivery system: Applications in fish biotechnology**. **Polymers** MDPI AG, 1 maio 2020. <https://doi.org/10.3390/polym12051177>.

YADAV, Jay Shankar Singh *et al.* Cheese whey: A potential resource to transform into bioprotein, functional/nutritional proteins and bioactive peptides. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 6, p. 756–774, 1 nov. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.07.002>.

YANG, Jinchuan *et al.* Determination of lactose in low-lactose and lactose-free dairy products using LC-MS. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 100, p. 103824, jul. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2021.103824>.

YENKIE, Kirti M.; WU, Wenzhao; MARAVELIAS, Christos T. Synthesis and analysis of separation networks for the recovery of intracellular chemicals generated from microbial-based conversions. **Biotechnology for Biofuels**, v. 10, n. 1, 8 maio 2017. <https://doi.org/10.1186/s13068-017-0804-2>.

YOU, Shengping *et al.* Utilization of whey powder as substrate for low-cost preparation of B-galactosidase as main product, and ethanol as by-product, by a litre-scale integrated process. **Bioresource Technology**, v. 245, p. 1271–1276, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.08.092>.

ZABOT, Giovani Leone *et al.* **Encapsulation of Bioactive Compounds for Food and Agricultural Applications**. **Polymers** MDPI, 1 out. 2022. <https://doi.org/10.3390/polym14194194>.

ANEXO A
CERTIFICADO TÉCNICO DO MICRORGANISMO
KLUYVEROMYCES MARXIANUS



**FUNDAÇÃO
ANDRÉ
TOSELLO**
TROPICAL DE PESQUISAS E TECNOLOGIA

Coleção de Culturas Tropical
www.cct.org.br

Fundação André Tosello
www.fat.org.br
R. Latino Coelho, 1301 - Pq. Taguaçu
CEP 13087-010 - Campinas - SP
Fone/Fax: (19) 3242-1022
Fax: (19) 3242-2827
CNPJ 46.126.123/0001-62

CERTIFICADO

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

CCT	Microrganismo	Referência	Lote
4086	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	ATCC 46537	T05/14H

Ref. Catálogo de Linhagens, Coleção de Culturas Tropical – CCT, Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia André Tosello, 1^a. 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 stant original é de um mês, a partir da data de incubação, desde que estocado sob temperatura controlada de 2 a 6°C e utilizados os métodos técnicos específicos para sua manipulação. A CCT se comprometerá a substituir culturas liofilizadas no período de até 3 meses após seu envio.



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

Campinas, 06 de Maio de 2013.

ANEXO B

Laudo técnico permeado de soro de leite em pó



Centro Oeste
LATICÍNIOS

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



Laudo Nº 002594

Produto: Permeado de Soro de leite em Pó
Marca: Centro Oeste
Cliente: Larissa Ramos

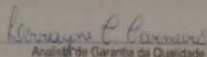
Data de Fabricação: 18/10/2023
Data de Validade: 18/10/2024
Data de Emissão: 27/12/2023
Lote: 620181023
Qtde: 05 kg

Embalagem Primária: Sacos de polietileno termossoldados
Embalagem Secundária: Sacos Kraft (02 folhas) costurados
Peso Líquido: 25 kg

Análise	Método	Padrão	Resultados	Unidade
Textura	FIL 99A: 1987	Pó uniforme, homogêneo e fino	Pó uniforme, homogêneo e fino	-
Aroma	FIL 99A: 1987	Odor agradável e lácteo de acordo com o padrão	Odor agradável e lácteo de acordo com o padrão	-
Sabor	FIL 99A: 1987	Sabor agradável e lácteo de acordo com o padrão	Sabor agradável e lácteo de acordo com o padrão	-
Umidade	FIL 26A: 1993	Máximo 4,0	1,50	%
Proteína	FIL 20B: 1993	Mínimo 0,5	2,38	%
Gordura	FAO, 1976	Máximo 1,5	0,00	%
Cinzas	Portaria 658/2022	Máximo 9,0	5,28	%
Acidez	ISO 6091/ IDF 086:2010	Máximo 1,8	1,02	% de ácido láctico
Lactose	Cálculo	Mínimo 80	90,8	%
Partículas Queimadas	ADMI boletim 916	Disco A e B	Disco A	Disco
pH (Sol. 10% a 20°C)	Adolfo Lutz	Mínimo 5,1	6,68	Faixa
Cont. Total Mesófilos	Petrifilm	m= 3,0 x 10 ⁴ M= 1,0 x 10 ⁵	1,4 x 10 ²	UFC/g
Coliformes Total	Petrifilm	m= 1,0 x 10 ¹ M= 1,0 x 10 ²	< 1,0 x 10 ¹	UFC/g
Coliformes Fecal	Petrifilm	m= < 1,0 x 10 ¹ M= 1,0 x 10 ¹	< 1,0 x 10 ¹	UFC/g
Staphylococcus coag. posit.	Petrifilm	m= 1,0 x 10 ¹ M= 1,0 x 10 ²	< 1,0 x 10 ¹	UFC/g
Enterobacteriaceae	Petrifilm	m= 1,0 x 10 ¹	< 1,0 x 10 ¹	UFC/g
Salmonella sp	Compact Dry	Ausente	Ausente em 25g	Ausente em 25g
Enterotoxinas	AOAC 2007.06	Ausente	Ausente	/25 g
Estafilocócicas(ng/g)*				

* Análise externa semestral

Aprovado: Sim (X) Não ()


 Analista de Garantia da Qualidade

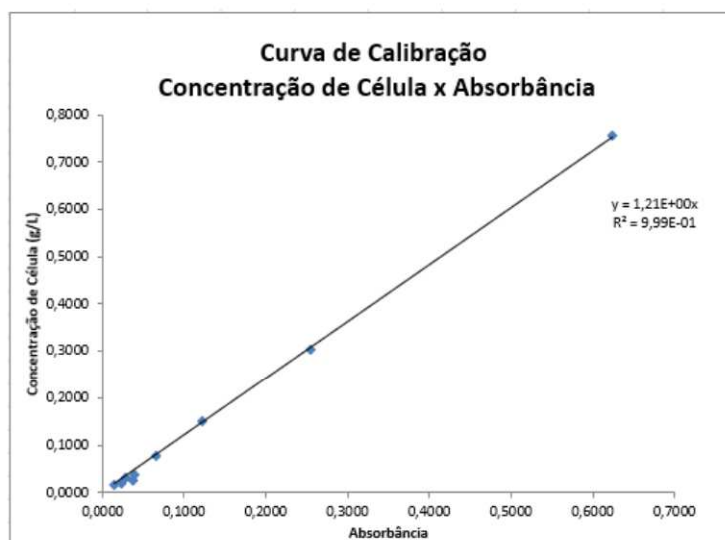
APÊNDICE A

DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CÉLULAS

A concentração celular foi obtida através da massa seca. Para isso coletou-se 150 mL do caldo fermentado do reator, e em seguida centrifugou-se sob refrigeração (3500rpm, 4°C, 10 minutos), o sobrenadante foi descartado, o decantado foi ressuspensionado em água deionizada (20mL), pesou-se em balança analítica junto com o recipiente e então foram colocadas em estufa não convectiva a uma temperatura de 80°C até que sua massa permanecesse constante. A massa seca foi então obtida pela diferença entre a massa final e a massa do recipiente. Para obter-se o valor da curva foi utilizado os valores obtidos da absorbância e a diferença obtida da massa seca. Os resultados utilizados para determinação da curva padrão, o gráfico e a equação da curva padrão obtida são apresentados abaixo.

Concentração de célula g/L	Absorbância
7,5590	
0,7559	0,6230
0,3024	0,2550
0,1512	0,1230
0,0756	0,0650
0,0378	0,0390
0,0302	0,0290
0,0252	0,0370
0,0189	0,0230
0,0151	0,0150

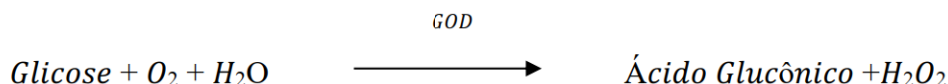
Fonte: o autor.



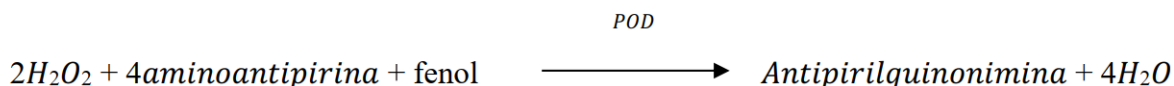
APÊNDICE B

DETERMINAÇÃO DE GLICOSE

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



Consequentemente, 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.

Este método pode ser utilizado em técnica manual e é facilmente aplicável em analisadores semi-automáticos e automáticos que medem 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.

	Branco	Teste	Padrão
Amostra	--	0,02 mL	--
Padrão	--	--	0,02 mL
Reagente 1	2,0 mL	2,0 mL	2,0 mL

Todos foram misturados vigorosamente e incubados em banho-maria a 37 ± 2 °C durante 10 minutos. Após esse tempo, 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.

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

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

APÊNDICE C

DESCONTO DA MALTODEXTRINA NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DO PÓ

Foi utilizado 0,375g de pó para realizar o teste de atividade enzimática da enzima seca por *spray drying*, quando a enzima foi seca com o uso de maltodextrina como agente carreador foi necessário fazer um ajuste de correção da maltodextrina da seguinte forma:

Foi descontado a umidade em base úmida para saber qual a quantidade em mL de líquidos (tampão) e qual a quantidade de secos (células) estavam presentes na solução de alimentação (SA) do *spray dryer*, sendo assim as células (g) foi somada a quantidade de maltodextrina (g) que é 100% de sólidos presentes na SA, para saber a quantidade (%) de apenas células presentes. Posteriormente o percentual de células obtidos foi utilizado para saber qual a quantidade (g) de células há na amostra (0,375g) presentes no teste de atividade enzimática. Finalmente a quantidade em Mmol/min de atividade enzimática obtida na amostra total (0,375g de células e maltodextrina) foi correlacionada para identificar a atividade enzimática real, em apenas (g) de células.