

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA – FEQUI
GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

DIONE CARLOS CARIAS

MÉTODOS DE IMOBILIZAÇÃO DA ENZIMA β -GALACTOSIDASE

**PATOS DE MINAS
DEZEMBRO 2018**

DIONE CARLOS CARIAS

MÉTODOS DE IMOBILIZAÇÃO DA ENZIMA β -GALACTOSIDASE

Trabalho de conclusão de curso apresentado à
Faculdade de Engenharia Química da
Universidade Federal de Uberlândia como
requisito parcial para obtenção do título de
Bacharel em Engenharia de Alimentos.

Orientadora: Prof. Dra.: Marta Fernanda Zotarelli

PATOS DE MINAS

DEZEMBRO 2018

DIONE CARLOS CARIAS

MÉTODOS DE IMOBILIZAÇÃO DA ENZIMA β -GALACTOSIDASE

Trabalho de conclusão de curso apresentado à Faculdade de Engenharia Química da Universidade Federal de Uberlândia como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Alimentos.

Banca de Avaliação:

Marta Fernanda Zotarelli
Prof. Dr^a.: Marta Fernanda Zotarelli

Orientadora

Carla Zanella Guidini
Prof. Dr^a.: Carla Zanella Guidini

Membro

Lilian M. Kuribayashi
Mr.: Lílian Mayumi Kuribayashi

Membro

Patos de Minas (MG), 12 dezembro de 2018.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me proporcionar o objetivo almejado durante todo o tempo, sempre me dando forças para continuar e nunca desistir por mais difícil que seria a caminhada.

A minha família, a base que me sustentou durante toda a minha vida. Meus pais Cecília e Francisco, e irmãos Diego, Willian, Cristiane e Jhonatan que apesar da distância sempre acreditaram em meu potencial e dedicação.

A minha tia Tânia, que sempre acreditou na minha capacidade, foram tantos obstáculos, mas, consegui vencê-los graças ao apoio, fundamental para que chegasse até aqui.

As minhas primas Samanta e Solange, obrigado por tudo! Todas as realizações foram possíveis através da força que me passaram, foram tantas reclamações, lamentações, lembram? Quantas vezes repeti as frases: “Engenharia é muito difícil!!” ou “Não vou conseguir!!” Mais enfim, está terminando um ciclo.

A meu amigo Alexandre, sempre me apoiando muito em várias conversas sobre cursos, músicas, até fizemos uma disciplina juntos, se recorda? A micologia “estudo dos fungos”. Desejo sucesso em sua nova jornada... da UFU para a vida, obrigado por tudo!

Querido amigo Cleiver Júnio, são tantas palavras para expressar em poucas linhas o tanto que tenho para agradecer-ló, começamos lá em Bioquímica I se lembra? Tantas noites sem dormir, em claro estudando IPQ, Física II, Operações unitárias.. Mas, conseguimos! Graças a Deus. Inspiro-me em você para fazer o meu melhor!!

As amigas Kamila “Xuu” e Yulaine “Yuh” sinto uma imensa falta de vocês, amizades sinceras da UFU até fizemos a prova do vestibular juntos, se lembram? Tantas recordações boas dos momentos de alegria, momentos de superação e apoio mútuo.

Aos amigos Anúbia e Maykon Júnior estiveram sempre comigo dando forças nas horas de desânimo, cada indivíduo tem seu próprio tempo, estávamos sempre questionando esta questão, o quão complexo é o campo da engenharia. E que jamais podemos desistir dos nossos sonhos e objetivos.

A Priscila Maia, amiga de turma sempre me auxiliando nos estudos em grupo, se lembra dos exercícios de FTII?? Foi um pouco complicado, mais ao final valeu muito a pena, logo estaremos trabalhando bem sucedidos atuando em uma empresa como engenheiros.

Aos demais colegas Ana Carolina, Camila Thiago, Gabriela (Gabi), Lara, Natália, Rosana, obrigado a todos!

Quero agradecer também imensamente minha orientadora Marta Fernanda Zotarelli, que me auxiliou durante todo meu TCC, a Carla Zanella Guidini que foi uma segunda orientadora para mim, obrigado! Por todas as sugestões, ensinamentos e todo o conhecimento adquirido.

Por fim, agradeço a todos os amigos que fizeram parte desta trajetória, sejam próximos ou à distância o apoio de vocês foi fundamental para esta conquista!.

MÉTODOS DE IMOBILIZAÇÃO DA ENZIMA β -GALACTOSIDASE

DIONE CARLOS CARIAS¹

MARTA FERNANDA ZOTARELLI²

CARLA ZANELLA GUIDINI³

RESUMO

As enzimas exercem um papel fundamental nos processos produtivos, e nas indústrias de alimentos. Além de diversas outras aplicações, como a indústria farmacêutica, têxtil, de papel e celulose, produção de detergentes, medicina, dentre outras. A deficiência ou redução da atividade enzimática da β -galactosidase no organismo humano leva a problemas na digestão da lactose. Cerca de 70% da população mundial, sofre com a deficiência intestinal da enzima β -galactosidase ou popularmente chamada de lactase, causando diversos problemas intestinais como inchaço abdominal, dores, náuseas e outros sintomas. Assim, uma alternativa viável é realizar a imobilização da enzima lactase, para então ser utilizada pelas indústrias de alimentos em seus processos produtivos. Nesse contexto se enquadra o presente trabalho, que objetivou reunir e apresentar os diferentes métodos de imobilização da enzima β -galactosidase. Foram realizadas buscas nas bases de dados *Scientific Eletronic Library On Line* (SciELO), *Science Direct*, Google acadêmico, Pub Med, *Scopus*, artigos de periódicos, repositórios de universidades e livros acadêmicos acerca do tema em estudo. Os estudos levantados mostraram que é possível imobilizar a enzima lactase utilizando diversos métodos e materiais de parede, podendo ser utilizadas industrialmente para a produção de alimentos com teor reduzido ou sem lactose para pessoas que apresentam restrição.

Palavras-chave: β -galactosidase, enzimas, imobilização, hidrólise de lactose.

¹ Graduando em Engenharia de Alimentos pela UFU-MG

² Doutora em Engenharia de Alimentos pela UFSC-SC e Professora da Faculdade de Engenharia Química- UFU

³ Doutora em Engenharia Química pela UFU-MG e Professora da Faculdade de Engenharia Química- UFU

METHODS OF IMMOBILIZATION OF THE ENZYME β -GALACTOSIDASE

ABSTRACT

The enzymes play a key role in the production process, and in the food industry. In addition to several other applications, such as the pharmaceutical, textile, pulp and paper industry, detergent production, medicine, among others. The deficit or reducing of activity enzymes of β -galactosidase in organism human cause problems digestion of lactose. About 70% of the world's population suffers from the intestinal deficiency of the enzyme β -galactosidase or popularly called lactase, causing various intestinal problems such as abdominal bloating, aches, nausea and other symptoms. Thus, a viable alternative is to carry out the immobilization of the enzyme lactase, to be used by the food industry in its production processes. In this context, the present work aims to collect and present the different methods of immobilization of the β -galactosidase enzyme. Searches were conducted in the *Scientific Eletronic Library On Line* (SciELO), *Science Direct*, Academic Google, Pub Med, *Scopus*, periodical articles, university repositories and academic books on the topic under study. Studies have shown that it is possible to immobilize the enzyme lactase using different methods and also using different wall materials, which can be used industrially for the production of foods with reduced or lactose-free content for people to presently restriction.

Key word: β -galactosidase, enzymes, immobilization, lactose hydrolysis.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
2. MATERIAL E MÉTODOS	11
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	12
3.1 Imobilização de enzimas	12
3.2 Imobilização por ligações a suportes insolúveis	15
3.3 Imobilização por retenção física	18
3.4 Coacervação complexa	20
3.5 <i>Spray Chilling</i>	22
3.6 <i>Spray Drying</i>	23
3.7 Revestimento em Leito Fluidizado	24
4. CONCLUSÃO	29
5. REFERÊNCIAS	30

1. INTRODUÇÃO

As enzimas são catalisadores altamente eficazes, as reações catalisadas por enzimas são caracterizadas pela formação de um complexo entre o substrato e a enzima. Estas agem diminuindo a energia de ativação e assim, aumentando a velocidade das reações (NELSON; COX, 2013).

A hidrólise da lactose em dois monossacarídeos simples glicose e galactose pela β -galactosidase é um processo importante na indústria de alimentos, para produção de produtos com baixo teor de lactose e elevado valor nutricional para pessoas com restrição a lactose. Na Figura 1 está ilustrado o processo de hidrólise da lactose

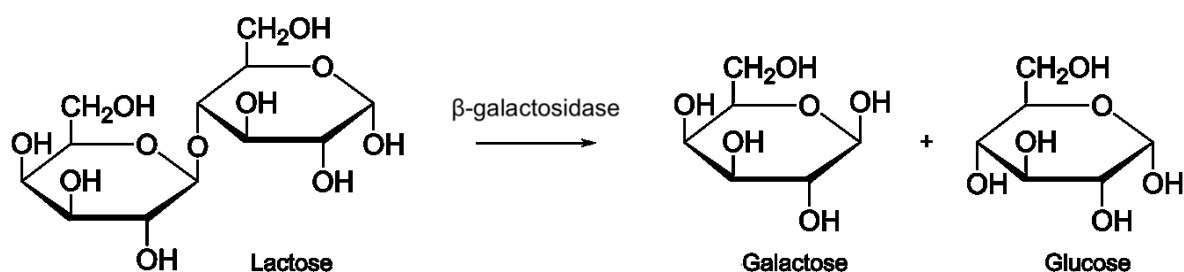


Figura 1 - Hidrólise enzimática da lactose e formação de glicose e galactose (NATH *et al.*, 2013)

A enzima β -galactosidase (E.C.3.2.1.23) é uma proteína popularmente conhecida como lactase, ou pelo seu nome sistemático β -D-galactosídeo-galactohidrolase, classificada como uma hidrolase que consegue hidrolisar a lactose (dissacarídeo), em glicose e galactose (monossacarídeos). É uma importante enzima utilizada na indústria de alimentos, no setor de laticínios e derivados (ANDRADE, 2005; OLIVEIRA, 2005; WANG *et al.*, 2010; FALLEIROS, 2012).

A β -galactosidase é uma importante enzima utilizada industrialmente para evitar a cristalização da lactose em sorvetes e concentrados de leite congelados, em culturas *starter* para queijos, modificação de produtos lácteos para produção de iogurtes, produtos de panificação e biscoitaria e produção de xaropes (hidrolisados de lactose) e para preparar alimentos para pessoas intolerantes à lactose (FELLOWS, 2006; BON *et al.*, 2008). Além da sua importância para a área alimentícia, a β -galactosidase também é relevante para a indústria farmacêutica, que a incorpora em fármacos para combater a intolerância à

lactose em indivíduos intolerantes (OLIVEIRA, 2005).

Acredita-se que mais de 70% da população mundial, apresentam deficiência intestinal da enzima lactase, levando principalmente a distúrbios como inchaço abdominal, dores, flatulência, diarreia e náusea. A porcentagem de intolerantes varia de acordo a etnia, e está relacionada com o consumo de produtos lácteos (HEYMAN, 2006).

A enzima β -galactosidase encontra-se espalhada pela natureza, e pode ser isolada a partir de origem vegetal (pêssego, amêndoas), animal (intestino, cérebro) e produzida por microrganismos (bactérias, leveduras e fungos), segundo Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) resolução nº 53/2014 (<http://portal.anvisa.gov.br>). Uma das limitações da aplicação desta enzima de origem vegetal e animal é seu elevado custo de produção e processo de purificação. Assim, uma forma de viabilizar economicamente esse processo é a obtenção dessa enzima por microrganismos e a utilização de métodos de imobilização. Dentre outras vantagens, a imobilização permite a reutilização da enzima, reduzindo os custos do processo quando aplicado pela indústria (OLIVEIRA, 2005).

Uma das formas de se imobilizar enzimas é o processo de microencapsulação. A microencapsulação é uma técnica recente, na qual um composto líquido, sólido ou gás, chamado material ativo ou núcleo é revestido com outro material, que permite a formação da parede (material encapsulante), formando uma cápsula que protege o núcleo de fatores externos como luz, pH e umidade. Encontram-se na literatura diversas denominações do material de revestimento como material transportador, casca, material de parede ou agente encapsulante (CARVALHO *et al.*, 2016).

A escolha do agente de revestimento das microcápsulas é de fundamental importância, pois de acordo com a aplicação desejada é realizada a escolha do material de parede. O material de parede pode ser solúvel ou insolúvel, contudo não devem reagir com o núcleo. Na área alimentícia dentre os mais comuns permitidos pela legislação podemos citar: carboidratos (amido, maltodextrina), celulose (carboximetilcelulose), gomas (arábica, carragena), lipídeos (óleos e gorduras) e proteínas (caseína, gelatina), dentre outros (BRASIL, 2006). A possibilidade do uso de diferentes agentes de revestimento é um dos fatores que contribuem para o crescente uso da microencapsulação por *spray drying*.

Apesar de que dentre todos os agentes citados, os materiais mais utilizados na microencapsulação geralmente são carboidratos, devido sua abundância na natureza, solubilidade, viscosidade, boas propriedades emulsionantes e seu custo baixo (DESAI e PARK, 2005).

De um modo geral, os principais métodos utilizados para a microencapsulação são: *spray drying*, *spray cooling*, revestimento em leito fluidizado, extrusão, liofilização, coacervação complexa, separação por suspensão em centrífuga, co-cristalização, armadilha de lipossomos e complexação de inclusão (DESAI e PARK, 2005). Dentre as técnicas citadas destaca-se o *spray drying*, uma vez que é um processo com custos relativamente baixos, flexível, reprodutível, que permite variação das condições operacionais, tempo curto para análise, sendo possível realizar um *scale-up*, comparando-o com os outros métodos de microencapsulação em relação aos modos de preparação da técnica, que consiste das seguintes etapas: preparação da dispersão, homogeneização e atomização da dispersão na entrada da alimentação (DESAI e PARK, 2005, ESTEVINHO *et al.*, 2015).

Tendo em vista o exposto anteriormente, esta revisão tem por objetivo, por meio de pesquisas, mostrar brevemente alguns dos principais métodos de imobilização com a enzima β -galactosidase.

2. MATERIAL E MÉTODOS

A revisão bibliográfica procura reunir o maior número possível de informações sobre o tema, buscando referenciar livros, artigos científicos, revistas, teses, dissertações, trabalhos de conclusão de curso, entre outros (MARTINS, 2001).

Para Marconi e Lakatos (2003) esta modalidade de pesquisa tem por finalidade fazer uma abordagem geral do assunto em questão. Com o intuito de agregar ainda mais a pesquisa, podendo buscar referências em bases de dados, em repositórios digitais de universidades, além de outras fontes.

Assim, a estruturação do trabalho foi realizada por revisão da literatura intitulada: *métodos de imobilização da enzima beta-galactosidase*, para assim, obter o maior número de informações possíveis sobre o assunto, e aprofundar no conhecimento do que está sendo estudado por outros autores sobre o tema.

O levantamento de dados foi realizado nas bases de dados *Scientific Eletronic Library On Line* (SciELO), *Science Direct*, Google Acadêmico, Pub Med, Scopus, artigos periódicos, repositórios de universidades e livros acadêmicos acerca do tema em estudo.

A população foi constituída de todos os artigos, livros, trabalhos de conclusão de curso, dissertações, teses, sites, entre outros. A amostra foi selecionada, a cerca de artigos, teses, dissertações e livros relacionados com o tema em estudo. Os quais foram selecionados a partir de uma leitura geral do assunto, analisando os dados e compilando-os, buscando compreender, ampliar e disseminar o conhecimento, contribuindo assim com a comunidade acadêmica.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Imobilização de enzimas

O processo de imobilização de enzimas surgiu a partir da observação da determinação da atividade biológica da enzima invertase com o carvão ativado por Nelson e Griffin em 1916. Estes autores verificaram que o suporte ainda permanecia ativo a hidrólise de sacarose mesmo após o carvão passar por processo de lavagem (BON *et al.*, 2008).

A imobilização de enzimas é uma técnica consolidada, utilizada em diversas áreas para diferentes finalidades. Uma das maiores vantagens da imobilização é o uso constante das enzimas permitindo assim gerar uma economia significativa no processo. As enzimas imobilizadas apresentam diversas outras vantagens, como: sua separação ao final do processo; possibilidade de operar em um sistema contínuo; maior controle e uniformidade do processo e pode alterar as propriedades catalíticas da enzima, gerando maior estabilidade ao pH e a temperatura e reduzindo os efeitos de inibição pelo substrato e produto (SUMNER, 1948; GRUBHOFFER & SCHLEITH, 1953; CHIBATA *et al.*; WINGARD, 1972; BORZANI *et al.*, 2001).

Atualmente existem dois métodos mais utilizados para conter uma enzima: imobilização no interior de um suporte (encapsulação e membranas) e imobilização na superfície de um suporte (ligação covalente e não covalente), conforme mostrado na Figura 2.

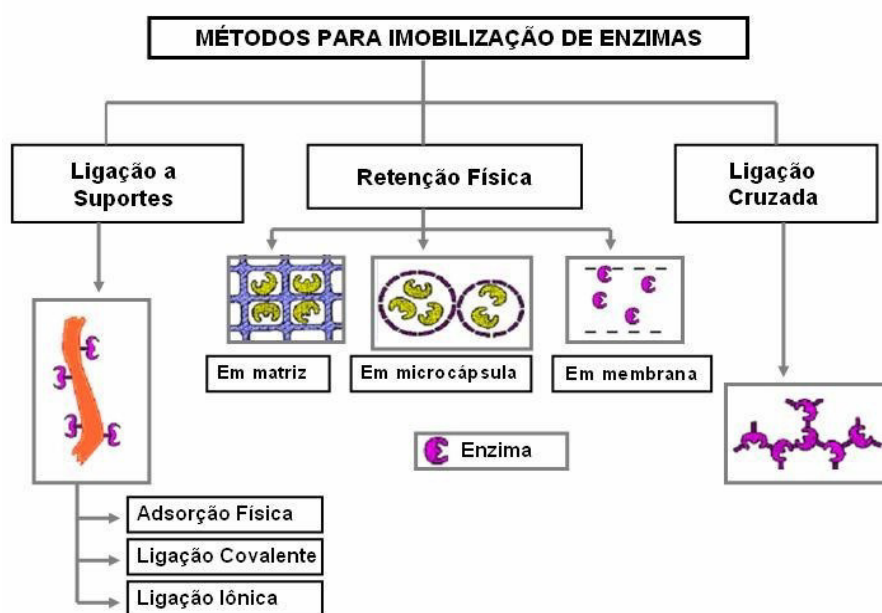


Figura 2- Diferentes métodos de imobilização de enzimas (adaptado DALLAVECCHIA *et al.*, 2004)

A escolha do procedimento mais adequado deve levar em consideração as propriedades físico-químicas do núcleo e do material de parede, conforme o tipo de aplicação desejada. A liberação das cápsulas ocorre de forma controlada, por meio de métodos químicos, como variações de pH, solubilidade ou mecânicos como temperatura, estresse mecânico, ou seja, qualquer perturbação no meio que possa assim, liberar as microcápsulas no tempo e local desejado (DESAI e PARK, 2005). No Quadro 1 estão apresentados alguns dos principais métodos de encapsulação e o tamanho das microcápsulas formadas pelos respectivos métodos.

Quadro 1- Métodos utilizados para encapsulação (Adaptado FAVARO-TRINDADE *et al.*, 2008).

Métodos de encapsulação	Materiais encapsuláveis	Faixa de tamanho (µm)
Métodos físicos		
a. <i>Spray drying</i>	Líquido/sólido	5-150
b. <i>Spray chilling e Spray cooling</i>	Líquido/sólido	20-200
c. Leito fluidizado	Sólido	>100
d. Co-cristalização	Sólido/líquido	-
Métodos físico-químicos		

Continua quadro 1

a. Coacervação simples	Líquido/sólido	20-500
b. Coacervação complexa	Líquido/sólido	1-500

Fim quadro 1

As cápsulas podem ser classificadas quanto ao seu tamanho: macrocápsulas ($>5000\ \mu\text{m}$), microcápsulas ($0,2\text{-}5000\ \mu\text{m}$) e nanocápsulas ($<0,2\ \mu\text{m}$) de diâmetro. Outra possível classificação é a que diz respeito à região interna, ou seja, se o núcleo é nitidamente concentrado na região central, envolvido por filme definido e contínuo do material de parede têm-se as microcápsulas verdadeiras, caso contrário, se o núcleo for disperso haverá formação das microesferas (AZEREDO, 2005). Na Figura 3 mostra microcápsulas de óleo de soja, como materiais de parede a lactose, concentrado proteico de leite e caseinato de sódio com diâmetro de $20\ \mu\text{m}$.

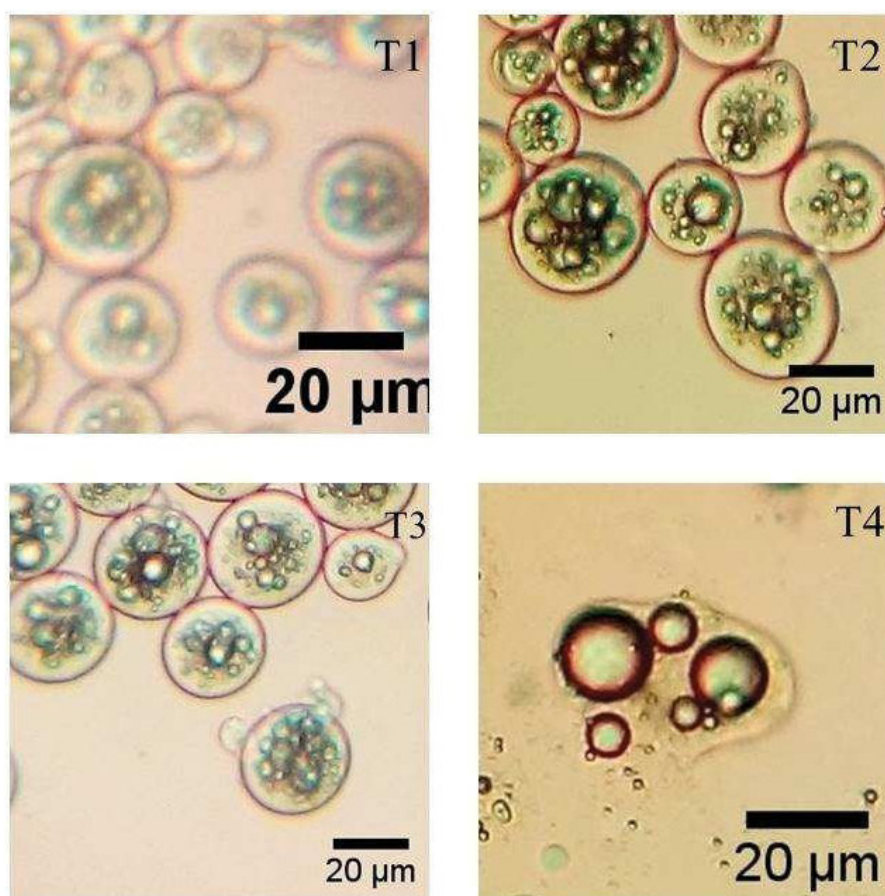


Figura 3- Microscopia de microcápsulas de óleo de soja por coacervação complexa (BRAGA, 2015)

3.2 Imobilização por ligações a suportes insolúveis

a) Adsorção física

A adsorção física é o método mais simples e empregado para imobilização de enzimas. O princípio do método se baseia em imobilizar as enzimas no suporte por meio de ligações como interações hidrofóbicas, forças de Van der Waals, ligações de hidrogênio, ligações iônicas. As reações em meio orgânico não necessitam fortes interações entre a enzima e o suporte, assim, a enzima é insolúvel no meio apolar, tornando a adsorção física um bom método de imobilização (CHIBATA, 1978; GÉKAS e LOPEZ-LEIVA, 1985; RESENDE *et al.*, 2017).

As principais vantagens da imobilização pelo método de adsorção física estão na facilidade da técnica, baixo custo em relação a não necessidade de ativação do suporte e possibilidade de reutilização do suporte por várias vezes. A adsorção favorece pouca alteração conformacional na enzima, pois, a enzima é imobilizada na orientação preferencial e energeticamente favorável. Porém, o método apresenta desvantagens como, aleatoriedade de interação enzima-suporte, podendo ocorrer a dessorção da enzima em funções de variações de temperatura, pH e força iônica (RESENDE *et al.*, 2017).

Papayannakos e Markas (1993) estudaram a modelagem e simulação da hidrólise de lactose através da β -galactosidase livre e imobilizada, oriunda de *Aspergillus niger*, por adsorção física em membrana porosa e também por entrecruzamento com agente reticulante glutaraldeído, os autores alcançaram uma estabilidade operacional de até 135 dias de operação (PAPAYANNAKOS e MARKAS, 1993).

Fischer (2010) realizou o estudo da hidrólise de lactose por β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* imobilizada em reator de leito fixo. Por método combinado de adsorção física e ligação cruzada com adição de glutaraldeído, como suporte utilizou a resina de troca iônica Duolite A-568, o autor constatou-se que a temperatura ótima de imobilização foi de 60°C, a enzima imobilizada manteve sua atividade após 90 dias de armazenamento em tampão acetato 0,1 M pH 4,5-4,0 $\pm$ 2°C, indicando a manutenção da estabilidade na estocagem.

Freitas (2007) estudou a otimização do processo de imobilização de β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* em alginato de sódio com gelatina e glutaraldeído, o autor verificou temperatura ótima de imobilização de 60°C, semelhante ao estudo de

Fisher (2010). O pH da enzima imobilizada foi 5,0 e a enzima na forma imobilizada perdeu 15% de sua atividade após 16 usos.

b) Ligação iônica

O princípio deste método é similar ao da adsorção física, porém, a diferença está na força de ligação, pois nesta técnica há formação de uma ligação iônica entre a enzima e o suporte, sendo que os resíduos fazem a troca de íons. As forças de ligação nesse método são mais fortes do que o método de adsorção física citada anteriormente. Assim, como na adsorção física este método poderá ser passível de ocorrer a dessorção da enzima (BON *et al.*, 2008).

c) Ligação covalente

É um dos métodos mais difundidos e conhecidos, mas também é considerado um dos mais complicados, devido à força de ligação ser bem forte. Uma das restrições deste método se baseia na necessidade de ativação do suporte, antes do processo de imobilização. Há menores possibilidades da enzima se desprender do suporte, entretanto durante a imobilização há maiores riscos de desnaturação da enzima, por conta da maior modificação química e física que o suporte induz sobre a proteína (WEETALL, 1975).

Com o intuito de melhorar a imobilização é possível fazer uma combinação de métodos para melhores resultados. Além disso, é possível utilizar um agente reticulante que forma uma ligação covalente entre o grupo radical ativo e estável do suporte, juntamente com a molécula de proteína a ser imobilizada. O glutaraldeído é um agente reticulante bastante utilizado em processos nas indústrias de alimentos (BON *et al.*, 2008).

Falleiros (2012) estudou o processo de imobilização e estabilização de β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* por ligações multipontuais em resina Duolite A568, utilizando glutaraldeído como agente reticulante. O autor concluiu que, utilizando processos combinados como a imobilização por adsorção, seguido de etapa de estabilização e posteriormente ao processo de ligação cruzada, conseguiu um aumento da atividade enzimática em 44%. A enzima imobilizada manteve sua atividade após 100 dias de armazenamento, em tampão acetato pH a $4,5 \pm 4,0 \pm 2,0$, indicando manutenção da estabilidade da enzima no período de estocagem.

d) Ligação metálica

Esta técnica é baseada em propiciar a formação de uma ligação metálica, ou quelação entre metais de transição, que podem ser utilizados para unir o conjunto enzima-suporte. Embora a ligação envolvida neste tipo de método seja covalente, há momentos em que podem ocorrer a dessorção da enzima em processos de longa duração (KENNEDY e CABRAL, 1987).

Os sais metálicos mais utilizados são TiCl_3 , TiCl_4 , $\text{Ti}_2(\text{SO}_4)_3$, FeCl_3 e FeSO_4 . O processo de imobilização através de ligação metálica consiste de imergir o suporte com numa solução metálica, secar, lavar com água destilada para remover o excesso de sais, e em seguida deixar em contato diretamente com a enzima, em condições de pH ótimo da enzima (VICENTE, 2000).

Gennari *et al.* (2017) realizaram o estudo da imobilização com β -galactosidase (*Aspergillus oryzae*) (Gal), usando o colágeno (Col) como um potencial biocatalizador para hidrolisar lactose por processo em batelada, utilizando quatro diferentes métodos com ácido acético, glutaraldeído (Glu), alumínio (Alu) e combinação de alumínio com glutaraldeído. As melhores produções e eficiências foram constatadas segundo os autores, com o uso do alumínio (Col-Alu-Gal e Col-Alu-Glu-Gal). A estabilidade operacional de lactase imobilizada em Col-Alu e Col-Alu-Glu, com retenção de 60% da atividade inicial após 90 dias a 4°C.

e) Ligações cruzadas ou cross-linking

As enzimas, além de fazer ligações com o suporte também podem realizar ligações entre si, que é o caso da ligação cruzada ou também chamado de *cross-linking*. A solução de enzimas na presença de um agente reticulante como o glutaraldeído, mais utilizado nos processos de imobilização, há a formação de géis de pureza elevada. A maior vantagem deste método é conseguir uma enzima com alta pureza, pois requer um agente reticulante bi ou multifuncional para que ocorra uma reação simples. A desvantagem é a necessidade do método em requerer uma grande quantidade de enzima, e pouco instável, além de gerar uma perda da atividade por conta da participação do sítio ativo na ligação (KENNEDY e CABRAL, 1987).

O processo de *cross-linking* pode ocorrer entre as enzimas, contudo outra forma pode surgir, chamada de ligações co-cruzadas (*co-cross-linking*), quando estas ligações

surtem entre a enzima e outro composto, geralmente proteína inativas. Um exemplo deste método é a cristalização de enzimas e *co-cross linking* com albumina, este processo é recomendado quando ocorrem efeitos difusionais causados pelo *cross-linking*, aplicando uma segunda proteína não enzimática (OLIVEIRA, 2007).

Eskandarloo e Abbaspourrad (2018) realizaram o estudo de produção de galacto-oligossacarídeos (GOS), da permeação de soro de leite, com β -galactosidase (*Aspergillus oryzae*) em reator contínuo de cama empacotada de vidro com fluxo ascendente, pelo método de ligações cruzadas, utilizando como material de revestimento o 3-aminopropil trietoxisilano (3-APTES), o incremento de pH e a estabilidade térmica foram observados para a enzima imobilizada, os autores verificaram uma máxima atividade da enzima imobilizada em pH 5,2 e temperatura de 60°C. A máxima produção de GOS de 25,2% com uma vazão de alimentação do permeado de 0,5 mL/h, com uma conversão de lactose de 43,9%. O sistema imobilizado perdeu apenas 4,6% de GOS após 8 ciclos de usos, demonstrando uma elevada eficiência e reuso da enzima.

Kessi e Arias (2018) avaliaram o uso da membrana da casca de ovos, como matriz para a imobilização de β -galactosidase (*E. coli*) por ligações cruzadas, usando o glutaraldeído. Os autores demonstraram que houve similaridade entre a enzima livre e imobilizada, sendo a enzima imobilizada estável e passível de ser usada diversas vezes.

3.3 Imobilização por retenção física

O método consiste basicamente em reter as enzimas nos espaços vazios, ou chamados poros dentro do suporte polimérico, que podem ser géis, fibras ou membranas. As enzimas, então, ficam presas, mas, é importante permitir um fluxo de substrato e produto através e dentro da rede polimérica (CHIBATA, 1978; KENNEDY e CABRAL, 1987).

- *Oclusão em géis*: ocorrem em géis que não reagem com a água, são obtidos geralmente por polimerização através de sistemas bifásicos, gerando assim, um maior controle do tamanho das partículas, géis de colágeno, ágar, alginato (KENNEDY e CABRAL, 1987). As enzimas ficam dispersas em uma solução, porém, com restrição em sua mobilidade por uma rede de gel formada, ao serem misturadas juntamente com os componentes do gel, ocorre o processo de gelatinização e assim a enzima fica retida na matriz do gel. Um fator fundamental é a porosidade da matriz, evitando a perda da enzima. Contudo,

podem ocorrer limitações do fluxo de difusão do substrato e produtos, reduzindo a eficiência catalítica da enzima (GIRELLI *et al.*, 2005). Freitas (2007) estudou-se a influência conjunta das concentrações de géis constituídos de alginato de sódio, gelatina e glutaraldeído no processo de imobilização de β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* e a cinética de hidrólise de lactose pela enzima nas formas solúvel e imobilizada.

- *Oclusão em fibras*: É um método semelhante à fabricação de fibras têxteis. As moléculas do polímero são dissolvidas em um solvente orgânico, e depois são emulsionadas na solução de enzima. A emulsão é extrusada junto com um agente coagulante como o éter de petróleo ou tolueno. Precipitando o polímero, juntamente com as enzimas retidas dentro das fibras (KENNEDY e CABRAL, 1987).
- *Microencapsulação*: A enzima fica retida dentro de cápsulas semipermeáveis, que permitem passagem de substrato pelo lado externo. É um processo que consegue microencapsular várias enzimas ao mesmo tempo. Como desvantagem é que esse método é restrito para substratos de elevado peso molecular (KENNEDY e CABRAL, 1987). A microencapsulação por coacervação complexa é um método que consiste misturar duas soluções hidrocolóides de cargas opostas, ocorrendo uma precipitação dos polímeros complexos, juntamente com as proteínas, formando assim as microcápsulas devido às forças eletrostáticas por alteração do ponto isoelétrico da fase aquosa (SILVA *et al.*, 2015). Braga (2015) realizou o estudo de constituintes do leite e soro de leite como material de parede no processo de microencapsulação de óleo de soja por coacervação complexa. Na Figura 4 está apresentado um esquema de como pode ser realizada a encapsulação utilizando a coacervação complexa.

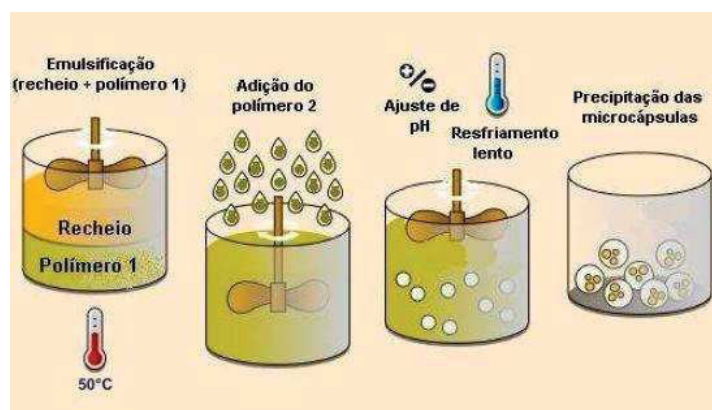


Figura 4- Modelo esquemático de encapsulação por coacervação complexa. Araújo, 2011

3.4 Coacervação complexa

A mistura de proteínas juntamente com os carboidratos, quando ocorre a redução do pH abaixo do ponto isoelétrico da enzima, pode acarretar na precipitação da proteína devido interações eletrostáticas entre as moléculas. A coacervação consiste de uma desagregação espontânea de fases, através da formação de um complexo insolúvel de polímeros, por consequência de interações eletrostáticas de moléculas maiores (JACKSON e LEE, 1991). Existe a coacervação simples quando apenas um tipo de polímero é utilizado como material de parede e a coacervação complexa, quando dois tipos diferentes de polímeros são utilizados como material de revestimento com cargas opostas, criando assim, uma atração eletrostática. Diversos fatores influenciam o processo de coacervação complexa como pH, concentração de polímeros, turbulência do sistema, tamanho das gotículas da emulsão, temperatura do processo e força iônica (SANTOS, 2014).

Entretanto, nem toda mistura de polímeros de cargas opostas formam coacervados, e nem todo coacervado é uma microcápsula. Para ocorrer a microencapsulação pelo método de coacervação complexa, é necessário garantir que os complexos formados envolvam o material ativo que se deseja encapsular (PRATA, 2006). Resumindo, a coacervação complexa envolve três etapas: formação de três fases: uma fase líquida que atua como veículo, uma fase do material a ser encapsulado, e uma terceira do material de parede.

Alguns dos empecilhos do método de coacervação complexa é a dificuldade de encapsular compostos hidrofílicos no núcleo. Esta técnica se aplica mais a compostos hidrofóbicos como material de recheio. Porém, para compostos hidrofílicos é necessária uma etapa a mais de emulsão (MENDANHA *et al.*, 2009).

Souza *et al.* (2018) estudaram a imobilização da β -galactosidase (*Kluyveromyces lactis*), através da complexação com polissacarídeos alginato de cálcio (ALG) ou l-carragena (CA). Os parâmetros cinéticos na formação do complexo e na eficiência da imobilização da enzima, como uma função do pH e razão dos polímeros foram estudados. O perfil de temperatura, estabilidade térmica e parâmetros cinéticos da lactase livre e imobilizada também foram analisados. Segundo os autores, o rendimento mostrou maior produtividade (97,17%) para o complexo LAC/ALG na proporção 5:1 lactase/alginato de cálcio, enquanto para o complexo LAC/CA um rendimento de (95,26%) na proporção 8:1 lactase/ l-carragena. O processo de coacervação complexa

diminuiu a atividade da enzima após a dissociação 83,2 e 69% para os complexos LAC/ALG e LAC/CA respectivamente. Na parte da análise da cinética, os autores determinaram a constante de Michaelis Mentem (K_m), e observaram o aumento dessa constante de 2,91 mM (enzima livre) a 3,43 mM (LAC/ALG) e 4,15 mM (LAC/CA). Enfim, os autores sugerem que o processo de complexação, pode ser um método útil para a imobilização da β -galactosidase.

- *Membranas semipermeáveis*: A solução enzimática é adicionada ao substrato de um mesmo lado da membrana polimérica, formando o sistema enzima-substrato (KENNEDY e CABRAL, 1987). Segundo Palai e Bhattacharya (2013) a enzima tem a possibilidade de ser imobilizada na superfície da membrana, por diferentes processos de ligação como adsorção física, ligação covalente ou iônica, ligação cruzada. A imobilização em membranas tem como vantagem pouca ou nenhuma limitação na transferência de massa, comparada ao método de oclusão em géis. Uma limitação no uso de membranas no processo de imobilização, é que podem ocorrer (*fouling*) incrustações (PALAI *et al.*, 2014).

Existem diferentes métodos de imobilização, por isso a escolha de um método universal e que seja aplicado para todas as enzimas é de difícil escolha. A escolha do método de encapsulação depende de diversos fatores, como: tipo de aplicação que será destinada a microcápsula, tamanho de partículas requerido, propriedades físicas e químicas do núcleo e do material de parede, mecanismos de liberação, escala de produção e custo (JACKSON & LEE, 1991). Além de fatores como uma boa retenção da atividade enzimática e uma elevada estabilidade operacional. No Quadro 2 foram sintetizados alguns métodos apresentados e suas principais características.

Quadro 2- Comparação entre métodos e suas características (KENNEDY e CABRAL, 1987).

Característica	Ligações Cruzadas	Adsorção Física	Ligação Iônica	Ligação Metálica	Ligação Covalente	Oclusão
Preparação	Intermediário	Simples	Simples	Simples	Difícil	Difícil
Força de ligação	Forte	Fraca	Intermediário	Intermediário	Forte	Intermediário
Atividade	Baixa	Intermediária	Alta	Alta	Alta	Baixa
Recuperação	Impossível	Possível	Possível	Possível	Rara	Impossível

Continua quadro 2

do suporte						
Custo	Intermediário	Baixo	Baixo	Intermediário	Alto	Intermediário
Estabilidade	Alta	Baixa	Intermediário	Intermediário	Alta	Baixa
Aplicabilidade geral	Não	Sim	Sim	Sim	Não	Sim
Proteção microbiana	Intermediário	Não	Não	Não	Não	Sim

3.5 *Spray Chilling*

Fim quadro 2

O *spray* de resfriamento/congelamento ou também conhecido por *spray chilling* é outro método de imobilização que se baseia no processo de solidificação de um *spray* líquido atomizado em partículas, este processo é adequado para produzir partículas em escala de microns a milímetros. Nos métodos de refrigeração e resfriamento por atomização, o sistema do núcleo com material de parede passa por um resfriamento, assim o material de revestimento se solidifica, aprisionando o material desejado no núcleo (DESAI & PARK, 2005).

O material de revestimento mais utilizado nesta técnica são lipídeos, como os óleos vegetais, uma vez que as microcápsulas são hidrofóbicas e, portanto insolúveis em água, outra propriedade que influencia é de ponto de congelamento de óleos que são mais baixos, com isso, não ocorre o congelamento do óleo pelo uso das baixas temperaturas. Diferentemente, da técnica de *spray drying* este método não apresenta evaporação de água, assim não tem um fluxo de transferência de massa, formando esferas ou microcápsulas de forma regular. Assim esta técnica pode-se aplicar a materiais solúveis em água no núcleo como enzimas, acidulantes, vitaminas hidrossolúveis. A técnica de *spray* de resfriamento apresenta alto rendimento, baixo custo e simples operação (DESAI & PARK, 2005).

Kwak *et al.* (2006) estudaram a eficiência e estabilidade de microcápsulas de β -galactosidase obtidas pelo método de imobilização de *spray chilling in vitro*, simulando condições gástricas e intestinais. Como materiais de revestimento foram utilizados o triacilglicerol de cadeia média (MCT) e o monoestearato de poliglicerol (PGMS). As maiores eficiências de microencapsulação foram de 91,5% e 75,4% para MCT e PGMS, respectivamente, e para ambos os materiais na proporção de 15:1 (material de parede:recheio). A simulação da estabilidade *in vitro* mostrou que 90% das microcápsulas de lactase não foram hidrolisadas em suco gástrico contendo pepsina,

diferente das microcápsulas de lactase, manteve sua atividade enzimática até o momento de ser liberada no intestino. Assim, os autores sugeriram que produtos lácteos, podem ser preparados com lactase microencapsulada.

3.6 *Spray Drying*

A remoção de água de produtos alimentícios é bastante praticada nas indústrias de alimentos, com o objetivo de manter a qualidade sensorial e nutricional dos produtos, diminuir as reações de degradação nos alimentos, reduzir os custos de armazenagem e transporte, aumentando a vida de prateleira dos alimentos.

Segundo Fellows (2000) a secagem por atomização teve início por volta da metade do século 18, com a desidratação de leite e ovo em pó. Com o aprimoramento da técnica foi possível seu uso em produtos alimentícios, preservando as características sensoriais dos alimentos. Existem muitos produtos industrializados que utilizam este tipo de secagem, como: leite, ovos e café.

Considerado um dos métodos mais utilizados para microencapsulação de alimentos, o princípio de funcionamento do *spray drying* é atomizar a solução alimentada ao secador de maneira a serem produzidas gotículas, que entram em contato com uma corrente de ar aquecida, que pode ser em fluxo paralelo ou contracorrente, dentro da câmara de secagem. Esse contato faz com que as gotículas sequem quase instantaneamente (FELLOWS, 2000). Além de ser um processo de secagem de alimentos, fármacos, materiais biológicos (como biofungicidas), este método também tem sido muito utilizado para a formação de cápsulas na microencapsulação. Na Figura 5 mostra o esquema de funcionamento de um *spray drying*.

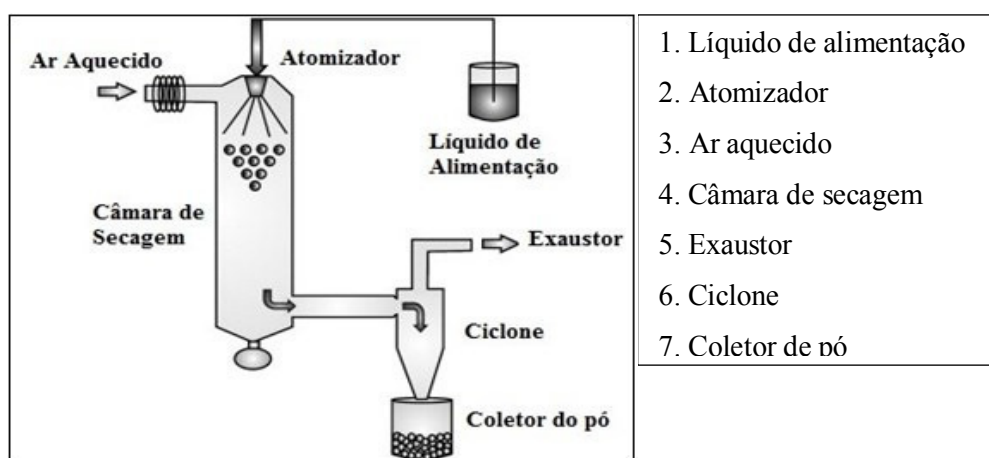


Figura 5- Esquema de funcionamento do *spray drying*

Estevinho *et al.* (2014) utilizaram o processo de *spray drying* para microencapsular β -galactosidase com os seguintes materiais de parede quitosana, quitosana modificada, alginato de cálcio, alginato de sódio e goma arábica. Os autores destacaram que o rendimento do produto variou entre 36 e 59% (para alginato de cálcio e goma arábica, respectivamente). Além disso, as microcápsulas, formadas com goma arábica apresentaram uma menor redução da atividade enzimática, seguida do alginato de cálcio, alginato de sódio e quitosana modificada.

Em um trabalho subsequente, os mesmos autores avaliaram o efeito do pH na formação de microcápsulas de β -galactosidase, produzidas pelo processo de *spray drying* (Estevinho *et al.*, 2015). Eles obtiveram resultados satisfatórios com microcápsulas, apresentando um diâmetro médio de 3,5 μm , a constante de Michaelis-Menten da enzima (K_m) diminuiu com a decréscimo do pH. O valor mais elevado de velocidade máxima ($V_{\text{máx}}$) foi encontrado em pH 6,0. O material de parede usado neste trabalho foi somente a quitosana modificada diferente do outro estudo anterior (Estevinho *et al.*, 2014) que utilizou além da quitosana modificada, outros materiais encapsulantes.

3.7 Revestimento em Leito Fluidizado

O revestimento de leito fluidizado foi desenvolvido por D. E. Wuster na década de 1950. Por isso, é um processo também conhecido pelo termo “processo Wuster”. As aplicações típicas do leito fluidizado na indústria de alimentos são: resfriamento e congelamento, secagem, liofilização, *puffing*, secagem por pulverização. O princípio do método se baseia em suspender partículas sólidas em uma câmara de alta velocidade, com temperatura e umidade controlada, onde o material de revestimento é atomizado. Diversos materiais de parede podem ser utilizados como os derivados de celulose, dextrinas, lipídeos, derivados proteicos, dentre outros (DESAI e PARK, 2005).

Esta técnica atualmente está sendo utilizada para alimentos, com intuito de aumentar a vida útil, mascarar algum sabor específico, melhorar as características sensoriais (LAKKIS, 2009). O método de revestimento em leito fluidizado pode ser modificado alterando-se a posição do bocal a ser usado para revestir as partículas sólidas. Os diferentes métodos para revestimento em leito fluidizado podem ser na seguinte configuração: *spray* superior, *spray* inferior e tangencial. Na Figura 6 está apresentado o esquema do processo de pulverização superior. Conforme pode ser

observado no esquema, o ar passa através de um leito de partículas do núcleo, para promover uma suspensão nas partículas, em seguida a solução de revestimento é pulverizada em contra corrente sobre as partículas fluidizadas. As partículas caminham através da zona de revestimento para a câmara de expansão, voltando para o recipiente do produto, circulando durante todo o processo. Este método é eficiente para revestir materiais de tamanho de até 100 mm.

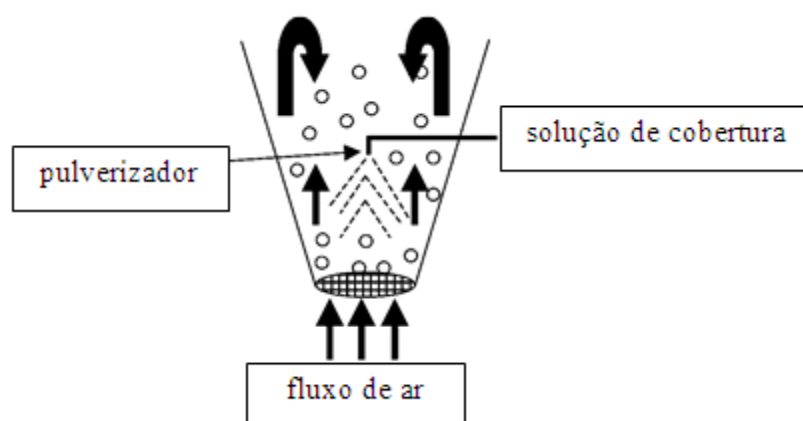


Figura 6- Esquema de um leito fluidizado por pulverização superior. Desai e Park, 2005

O método de *spray* inferior é amplamente utilizado para revestir partículas de até 100 mm e pode ser observado no esquema apresentado na Figura 7. As partículas são recirculadas através da zona de revestimento, com uma maior taxa (quantidade de partículas por tempo) e o padrão de fluidização é mais controlado, comparado ao método de *spray* superior. Uma das vantagens deste método em relação ao anterior é o caminho percorrido entre as partículas do material de revestimento e as partículas do núcleo é mais curto.

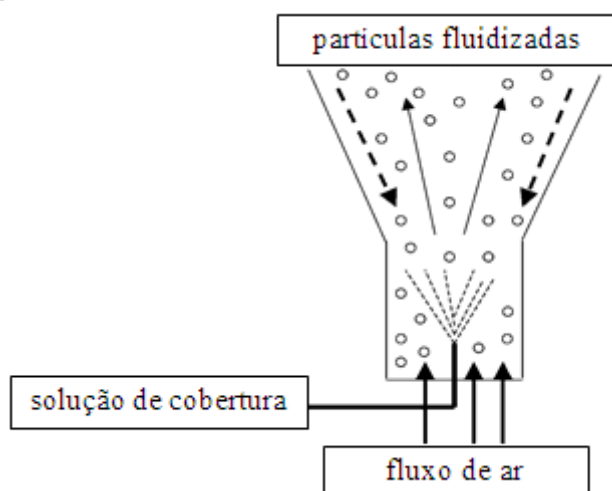


Figura 7- Esquema de um leito fluidizado por pulverização inferior. Desai e Park, 2005

Além dos dois métodos citados, existe uma terceira configuração para revestimento em leito fluidizado para partículas muito finas. O princípio básico da fluidização é a força da gravidade, é necessário um maior fluxo de ar anscendente para partículas fluidizarem. Neste método a força gravitacional é multiplicada pelo uso de um tambor perfurado rotativo, com a partícula a ser revestida em seu interior. Na Figura 8 está mostrada a configuração de um leito fluidizado por pulverização tangencial.

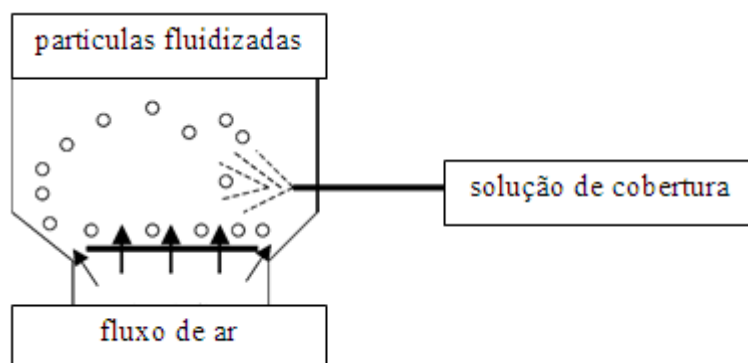


Figura 8- Esquema de leito fluizidado por pulverização tangencial Desai e Park, 2005

Carević *et al.* (2015) estudaram um processo de imobilização da β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* sobre a resina Purolite® A109 para melhorar sua atividade de galactosilação e aplicação na síntese de galactooligossacarídeos (GOS), melhorando a adsorção iônica com ativação do grupo carboxila na superfície com adição de carbodiimida, aumentando a estabilidade operacional para produção de GOS em um reator tipo batelada, utilizando um reator tipo leito fluidizado atingiu 73% de atividade retida após 10 ciclos. No quadro 3 abaixo mostra resultados encontrados para a imobilização da enzima β -galactosidase em diferentes métodos.

Quadro 3- Diferentes métodos de imobilização da enzima β -galactosidase

Enzima (Fonte)	Objetivo	Método de imobilização	Material de parede/Suporte	Resultados mais relevantes obtidos	Referências (Autor)
β -galactosidase (<i>Aspergillus oryzae</i>)	Microencapsulação de β -galactosidase com Eudragit L-100	Evaporação por solvente (polímero Eudragit L-100)	Eudragit L-100 com estearato de sacarose (estabilizador de gotículas)	- O estearato foi um bom estabilizante na formação de gotículas e na microencapsulação da β -galactosidase.	E. Squillante <i>et al.</i> (2003)
β -galactosidase (<i>Escherichia coli</i>)	Avaliar a influência da microencapsulação com quitosana modificada na atividade da β -galactosidase	Spray drying (bico 0,5mm; vazão 4ml/min; taxa fluxo de ar 32m ³ /h; ar pressão 6,5 bar; T° entrada 115°C; T° saída 54°C	Quitosona	- As micropartículas obtidas têm um diâmetro médio menor que 3,5 μ m e uma forma regular; - A atividade da β -galactosidase diminui quando microencapsulado; - Após seis meses de armazenamento, a atividade enzimática apresenta um pequeno decréscimo, embora não existam diferenças significativas aparência, cor e distribuição de tamanho de partícula foram identificados.	Estevinho <i>et al.</i> ; (2014)
β -galactosidase (<i>Escherichia coli</i>)	Avaliar o efeito do pH na formação de micropartículas de β -galactosidase produzidas por um processo de secagem por pulverização	Spray drying (bico 0,5mm; vazão 4ml/min; taxa fluxo de ar 32m ³ /h; ar pressão 6,5 bar; T° entrada 115°C; T° saída 58°C	Quitosana	- Micropartículas de β -galactosidase com diâmetro médio menor que 3,5 μ m foram obtidas. -Os parâmetros de Michaelis-Menten foram calculados; - O valor de Km diminui com o decréscimo do pH, que pode estar relacionado a um aumento da afinidade entre a enzima e o substrato para pH menor.	Estevinho <i>et al.</i> ; (2015)
β -galactosidase (<i>Aspergillus oryzae</i>)	Imobilização e estabilização de β -galactosidase por ligações multipontuais em Duolite A568	Adsorção com e sem (<i>cross-linking</i>) com glutaraldeído	Resina de troca iônica Duolite A568	-Aumento da atividade enzimática em 44% com processo combinado de adsorção com ligações cruzadas; -A enzima manteve sua atividade após 100 dias de armazenamento em tampão acetato pH a 4,5 a 4,0 $\pm$ 2,0, indicando manutenção da estabilidade da enzima no período de estocagem.	Falleiros (2012)
β -galactosidase (<i>Aspergillus oryzae</i>)	Realizar a hidrólise de lactose por β -galactosidase de	Adsorção e (<i>cross-linking</i>) com	Resina de troca iônica Duolite A568	- temperatura ótima de imobilização foi de 60°C; - A enzima imobilizada manteve sua	Fischer (2010)

	<i>Aspergillus oryzae</i> em reator de leito fixo	glutaraldeído		atividade após 90 dias de armazenamento em tampão acetato 0,1 M pH 4,5-4,0 ± 2°C, indicando a manutenção da estabilidade na estocagem.	
β-galactosidase (<i>Aspergillus oryzae</i>)	Imobilização de β-galactosidase de <i>Aspergillus oryzae</i> em resinas de troca iônica	Adsorção e (<i>cross-linking</i>) com glutaraldeído	Resina de troca iônica Duolite A568, Duolite S-761, Dowex Marathon A, Dowex Marathon C e Amberlite 252	- A resina que apresentou melhor resultado na imobilização de β-galactosidase por adsorção iônica foi a Duolite A-568; -A atividade da enzima imobilizada, sem o tratamento com glutaraldeído, após 30 usos foi de 51% em relação à inicial, ao passo que a atividade da enzima imobilizada com reticulação foi de 90% da inicial; - As condições ótimas para o processo de imobilização foram: tempo de 12 horas, pH 4,5 e concentração de enzima do meio de 16 g/L atingindo uma atividade de 0,64 U.	Guidini (2009)

Fim quadro 3

4. CONCLUSÃO

Existe atualmente uma infinidade de métodos de imobilização da enzima β -galactosidase, assim o método de escolha se torna complicado, pois não existe um método universal que atenda todos os requisitos necessários. Deve-se fazer uma avaliação de cada método, de acordo com a origem da enzima, os parâmetros ótimos da mesma, sua estabilidade operacional, custo de manutenção, e principalmente o uso pretendido, dentre outros fatores.

5. REFERÊNCIAS

ANDRADE, A. C. D. **Estudo da fermentação simultânea à hidrólise de soro de queijo utilizando lactose e *Saccharomyces cerevisiae***. 97f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2005.

AZEREDO, H. M. C. D. **Encapsulation: applications to food technology**. Alim. Nutri, Araraquara, v.16, n.1, p. 89-97, 2005.

BON, E. P. S., PEREIRA-JR, N., GOTTSCHALK, L. M. F., SÁ-PEREIRA, P., ROSEIRO, J. C., FERRARA, M. A. **Bioprocessos para produção de enzimas. Enzimas Em Biotecnologia: Produção, Aplicações E Mercado**, 2008.

BORZANI, W; SCHMIDELL, W; LIMA, U.A; AQUARONE, E. **Biotecnologia Industrial**, Volume 1, Fundamentos, 1a ed., São Paulo, Ed. Edgard Blücher Ltda., 254 p. 2001.

BRASIL. **Resolução RDC nº 25, de 10 fevereiro de 2006**. Aprova o regulamento técnico que dispõe sobre a extensão do uso do aditivo INS 414 Goma acácia/arábica na função de estabilizante para cervejas, com limite de uso quantum satis. Anvisa- Agência nacional de vigilância sanitária. Disponível em: www.anvisa.gov.br. Acesso em 14 de abril de 2018.

CAREVIĆ, M; ĆOROVIĆ, M; MIHAILOVIĆ, M; BENJANAC, K; MILISAVLJEVIĆ, A; VELICKOVIĆ, D; BEZBRADICA, D. **Galacto-oligosaccharide synthesis using chemically modified b-galactosidase from *Aspergillus oryzae* immobilised onto macroporous amino resin**. International Dairy Journal. V.54, 50-57. 2015.

CARVALHO, I. T; ESTEVINHO, B. N; SANTOS, L. **Application of microencapsulated essential oils in cosmetic and personal health care products- a review**. International journal of cosmetic science. V. 38, 109-119, 2016.

CHIBATA, I. **Imobilized enzymes- Research and development**. Tokyo. Kadansha Ltda. 1978.

CHIBATA, I; HE, B. L; JIANG, P; QIU, Y. B. **Characteristics of immobilized aminoacylase from *Aspergillus oryzae* on macroporus copolymers**. Fermentation technology today. Japan: G. Terni Ltda. 1972.

DALLA-VECCHIA, R; NASCIMENTO, M. G; VOLDI, V. **Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros**. Química nova. v.27, p. 623-630, 2004.

DESAI, K. G. H; JIN PARK, H. **Recent developments in microencapsulation of ingredients**. Drying technology, v.23 (7), p. 1361-1394, 2005.

ESKANDARLOO, H; ABBASPOURRAD, A. **Production of galacto-oligosaccharides from whey permeate using β -galactosidase immobilized of functionalized glass beads**. Food Chemistry, v.251, p.115-124, 2018

ESTEVINHO, B. N; DAMAS, A. M; MARTINS, P; ROCHA, F. **Microencapsulation of β -galactosidase with different biopolymers by a *spray drying* process**. Food Research International. v.64, p. 134-140, 2014.

ESTEVINHO, B. N; RAMOS, I; ROCHA, F. **Effect of the pH in the formation of β -galactosidase microparticles produced by a *spray-drying* process**. International journal of biological macromolecules, v. 78, p. 238-242, 2015.

FALLEIROS, L. N. S. S. **Imobilização e estabilização de β -galactosidase por ligações multipontuais em duolite A568**. 127f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2012.

FAVARO-TRINDADE, C. S; PINHO, S. M. D; ROCHA, G. A. **Revisão: microencapsulação de ingredientes alimentícios**. Brazilian journal of food technology. v. 11, p. 103-112, 2008

FELLOWS, P. J. **Food Processing Technology**. Food Processing Technology.

2000.

FISCHER, J. **Hidrólise de Lactose por b-galactosidase de *Aspergillus oryzae* Imobilizada em Reator de Leito Fixo.** 138 f. Dissertação (Mestrado)- Curso de Programa de Pós Graduação em Engenharia Química, Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2010.

FREITAS, F. F. **Otimização do processo de imobilização de b-galactosidase de *Aspergillus oryzae* em Alginato de sódio com gelatina e glutaraldeído.** 247 f. Tese (Doutorado)- Curso de Programa de Pós Graduação em Engenharia Química, Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2007.

GÉKAS, V; LOPEZ-LEIVA, M. **Hidrolisis of lactose: a literature review.** Process biochemistry, v.20, p. 2-12, 1985.

GENNARI, A; MOBAYED, F. H; VOLPATO, G; SOUZA, C. F. V. D. **Chelation by collagen in the immobilization of *Aspergillus oryzae* β -galactosidase: A potential biocatalyst to hydrolyze lactose by batch processes.** International Journal of Biological Macromolecules. V 109, p. 303-310, 2018.

GRUBHOFFER, N; SCHELEITH, L. **Modified ion exchangers stationary phases in chromatography.** Naturwissenschaften. v.40, p. 508, 1953.

HEYMAN, M. B. **Lactose intolerance in infants children, and adolescents. American academy of pediatrics committee on nutrition.** Pediatrics. v.118 n.3, 2006.

JACKSON, L. S; LEE, K. **Microencapsulation and the food industry.** Lebensmittel Wissenschaft Und Technologie, v.24, p. 289-297, 1991.

KENNEDY, J. F; CABRAL, J. M. S. **Enzyme immobilization in biotechnology.** v.7a, p. 347-404, 1987.

KESSI, E; ARIAS, J. L. **Using natural waste material as a matrix for the immobilization of enzymes: chicken eggshell membrane powder for β -galactosidase immobilization.** Appl Biochem Biotechnol. v.187, p.101-115, 2018

KWAK, H. S; KWON, S. H; LEE, J. B; AHN, J. ***In vitro* stability of beta galactosidase microcapsules.** Department of food science and technology. Anim. Sci. v.15, n.12, p. 1808-1812, 2002.

MARCONI, M; LAKATOS, E. **Fundamentos de metodologia científica**, p.310, 2003.

MARTINS, G. A; PINTO, R. L. **Manual para elaboração de trabalhos acadêmicos.** São Paulo: Atlas, 2001.

MENDANHA, D. V; MOLINA ORTIZ, S. E; FAVARO TRINDADE, C. S; MAURI, A; MONTERREY-QUINTERO, E. S; THOMAZINI, M. **Microencapsulation of casein hidrolysate by complex coacervation with SPI/Pectin.** Food research internationaly. v. 42. 1099-1104. 10.1016/j.foodres.2009.05.007.

NATH. A; BHATTACHARJEE, C; CHOWDHURY, R. **Synthesis and separation of galacto-oligosaccharides using membrane bioreactor.** Desalination. v.316, p. 31-41, 2013.

NELSON, D. L., COX, M. M. **Lehninger Principles of Biochemistry.** 6th ed. Book. p 189-190, 2013.

OLIVEIRA, C. C. M. D. **Produção de β -galactosidase por levedura recombinante-Desenvolvimento de um sistema de produção estável.** 100f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia), Universidade de Minho, Braga, 2005.

PALAI, T., BHATTACHARYA, P. **Kinetics of lactose conversion to galactooligosaccharides by β -galactosidase immobilized on PVDF menbrane.** Journal of Bioscience and Bioengineering, v. 115, n. 6, p. 668-673, 2013.

PALAI, T., SINGH, A. K., BHATTACHARYA, P. K. **Enzyme, β -galactosidase immobilized on membrane surface for galacto-oligosaccharides formation from lactose: Kinetic study with feed flow under recirculation loop.** Biochemical Engineering Journal, v. 88, p. 68-76, 2014.

PRATA, A. S. **Estudo dos parâmetros físico-químicos envolvidos na formação de microcápsulas produzidas por coacervação complexa.** 267f. Tese (Doutorado em Alimentos e Nutrição), Universidade Estadual de Campinas. São Paulo, 2006.

RESENDE, R. R; SOCCOL, C. R; FRANÇA, R. L. D. **Biotecnologia aplicada à agro & indústria fundamentos e aplicações.** v. 4, Editora: Blucher, p. 1070, 2017.

SANTOS, M. G. D. **Desenvolvimento e caracterização de microcápsulas de xilitol e mentol por coacervação complexa e sua aplicação em gomas de mascar.** 213f. Tese (Doutorado em Ciências), Universidade de São Paulo. Pirrasununga, 2014.

SILVA, T. M. D. S; RODRIGUES, L. Z; CODEVILLA, C. F; SILVA, C. B. D; MENEZES, C. R. D. **Coacervação complexa: uma técnica para a encapsulação de probióticos.** Ciência e Natura. Santa Maria v. 37 Ed. Especial Nano e Microencapsulação de compostos bioativos e probióticos em alimentos, 2015, Dez p. 49-55.

SOUZA, C. J. F; GARCIA-ROJAS, E. E; FAVARO-TRINDADE, C. S. **Lactase (β -galactosidase) immobilization by complex formation: impact of bipolymers on enzyme activity.** Food Hydrocolloides. v.83, p. 88-96, 2018.

SUMNER, J. B. **Denaturation of urease without inactivation.** Science. v. 108. p.410, 1948.

VICENTE, A.A. **Preparação de açúcar invertido por meio de invertase imobilizada em sílica.** Dissertação de mestrado. Instituto de Química. Universidade Paulista (UNESP), 2000.

WANG, K.; LI, G.; YU, S.Q.; ZHANG, C. T; LIU, Y. H. **A novel metagenome-derived β -galactosidase: gene cloning, over expression, purification and characterization.** Appl Microbiol Biotechnol. v.88, p. 155-165, 2010.

WEETALL, H. H. **Immobilized enzymes and their application in the food and beverage industry.** Process Biochemistry, p. 3-30, 1975.

WINGARD, JR. **Enzyme engineering: a new area of specialization.** Biotechnol. Biogen. Symp. v.3, p. 3-13, 1972

