



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA



**ESTUDO COMPARATIVO DOS PROCESSOS PRODUTIVOS,
PROPRIEDADES E APLICAÇÕES DE β -GALACTOSIDASE OBTIDA
DE DIFERENTES FONTES**

ANA PAULA BASMAGI E FREITAS

Uberlândia – MG

Novembro/2017



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA



**ESTUDO COMPARATIVO DOS PROCESSOS PRODUTIVOS,
PROPRIEDADES E APLICAÇÕES DE β -GALACTOSIDASE OBTIDA
DE DIFERENTES FONTES**

Ana Paula Basmagi e Freitas

Monografia de graduação apresentada à Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos necessários para a aprovação na disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso do curso de Engenharia Química.

Uberlândia – MG
Novembro/2017

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA MONOGRAFIA DA DISCIPLINA
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO DE ANA PAULA BASMAGI E FREITAS,
APRESENTADA À UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA, EM 05 DE
DEZEMBRO DE 2017.

BANCA EXAMINADORA:

Profa. Dra. Larissa Nayhara S. Santana Falleiros
Orientador – FEQUI/UFU

Prof. Dr. Eloízio Júlio Ribeiro
FEQUI/UFU

Aluno(a) de Mestrado: Carla Cristina de Sousa
FEQUI/UFU

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Marcos e Cristina, ao meu irmão Kinho, aos meus tios, Bia e Leandro e ao meu namorado Leonardo por todo apoio, compreensão, paciência e amor incondicional em todos os momentos desta e de tantas outras caminhadas da vida.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por sempre me guiar e iluminar meus passos.

Aos meus pais, Marcos e Cristina, por todo esforço, apoio e amor durante as etapas desta difícil caminhada. Esta conquista é por vocês e para vocês.

Ao meu irmão Kinho, pelo valioso apoio, companheirismo, incentivo e conselhos durante toda minha vida, mas especialmente durante os anos de estudo e dedicação.

Aos meus tios, Bia e Leandro, meus segundos pais, pelo carinho, amor e suporte que tanto me fortalecem.

Ao meu namorado Leo, pela paciência, compreensão e incentivo nos momentos difíceis desta e de outras etapas.

Aos meus amigos Paola e Muntaser por sempre estarem comigo nos momentos bons e não tão bons assim.

À minha orientadora prof^a Larissa, por guiar este trabalho, por toda ajuda, paciência e incentivo na conclusão deste projeto.

Aos meus amigos de UFU, pessoas especiais e fundamentais na conclusão de mais uma etapa da vida. Amigos que quero levar comigo por toda a vida.

À banca examinadora por terem aceitado o convite e contribuírem com o enriquecimento do trabalho.

Que venha a nova vida!

“A vida é feita de momentos, momentos pelos quais temos que passar, sendo bons ou não, para o nosso aprendizado. Nada é por acaso. Precisamos fazer a nossa parte, desempenhar o nosso papel no palco da vida, lembrando de que a vida nem sempre segue o nosso querer, mas ela é perfeita naquilo que tem que ser.”

Chico Xavier

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	i
LISTA DE TABELAS.....	i
RESUMO.....	ii
CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO.....	3
CAPÍTULO 2 - OBJETIVOS.....	4
CAPÍTULO 3 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
3.1 LACTOSE	5
3.2 REAÇÃO DE HIDRÓLISE DA LACTOSE.....	7
3.2.1 Hidrólise Ácida	9
3.2.2 Hidrólise Enzimática	10
3.2.3 Formação de Galactooligossacarídeos (GOS).....	11
3.2.4 Cinética da Hidrólise da Lactose.....	14
3.3 ENZIMAS.....	16
3.3.1 Imobilização Enzimática	17
3.4 β -GALACTOSIDASE.....	21
3.4.1 Aplicações de β -Galactosidases	22
3.5 FONTES DE OBTENÇÃO DA β -GALACTOSIDASE.....	24
3.5.1 β -Galactosidases de Leveduras	28
3.5.1.1 Estudos Referentes à β -Galactosidases de Leveduras	29
3.5.2 β -Galactosidases de Fungos	32
3.5.2.1 Estudos Referentes à β -Galactosidases de Fungos.....	33
3.5.3 β -Galactosidases de Bactérias	35
3.5.3.1 Estudos Referentes à β -Galactosidase de Bactérias	36
3.6 ESTUDO COMPARATIVO	38
3.6.1 pH Ótimo e pH de Estabilidade.....	38
3.6.2 Temperatura	39
3.6.3 Produção de Galactooligossacarídeos	39
3.6.4 Técnicas de Recuperação Enzimática	40
CAPÍTULO 4 - CONCLUSÕES.....	42
CAPÍTULO 5 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura das moléculas de lactose, galactose e glicose (ZADOW, 1984).	7
Figura 2 – Processos de hidrólise da lactose (HOBMAN, 1984).	8
Figura 3 – Processo de produção industrial de galactooligossacarídeos (LISBOA, 2009).	13
Figura 4 – Métodos de imobilização de enzimas (FISCHER, 2010).	19
Figura 5 – Esquema representativo da atividade catalítica da β -galactosidase frente à molécula de lactose (MATTHEWS, 2005).	21

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Propriedades da lactose relevantes na indústria de alimentos.	5
Tabela 2 – Parâmetros cinéticos obtidos utilizando a enzima β -galactosidase.	15
Tabela 3 – Comparação entre técnicas de imobilização.	20
Tabela 4 – Possíveis fontes microbiológicas de obtenção de β -galactosidase.	26
Tabela 5 – Propriedades de algumas β -galactosidasas microbianas.	27

RESUMO

O uso da enzima β -galactosidase tem se mostrado cada vez mais importante na indústria de laticínios, visto que é a enzima responsável pela reação de hidrólise da lactose e consequente síntese dos monômeros glicose e galactose. Além de indispensável na produção de leite e derivados com baixos teores de lactose, a β -galactosidase também possui grande aplicação na produção de galactooligossacarídeos, importantes compostos com características prebióticas. Diante de tamanha relevância na indústria de laticínios e importante aplicação biotecnológica, a enzima β -galactosidase tem sido alvo de inúmeros estudos objetivando sua síntese e otimização de seus processos produtivos através de diversas fontes de obtenção, principalmente fontes microbiológicas. Neste contexto, objetivou-se neste trabalho a realização de uma revisão bibliográfica de conceitos associados à produção enzimática de β -galactosidase através do estudo de suas aplicações e utilidades, bem como uma avaliação das propriedades da enzima de acordo com sua fonte de obtenção e condições operacionais de produção. Através de estudos realizados por diversos autores, foi possível realizar uma análise de quais fontes apresentam maiores facilidades de obtenção e recuperação enzimática, bem como uma análise de novas técnicas capazes de otimizar o processo produtivo, como por exemplo, a utilização de microrganismos recombinantes e o conceito de enzimas à frio.

Palavras-chave: β -galactosidase, lactose, produção enzimática, fontes microbiológicas.

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

Dentre os grupos que compõem a pirâmide alimentar, o grupo constituído pelo leite e seus derivados apresenta-se como um dos mais importantes e fundamentais. Esses alimentos são ricos em minerais e proteínas que auxiliam na formação dos tecidos musculares, ósseos e nervosos. O leite também é uma importante fonte de cálcio, fósforo e vitamina B12. Dentre os componentes do leite, a lactose é o carboidrato mais abundante e, quando hidrolisada, apresenta maior poder adoçante e maior solubilidade, além de apresentar diversas vantagens adicionais que permitem a obtenção de novos produtos economicamente atrativos, como por exemplo, produtos com baixo teor de lactose destinados a pessoas com intolerância a esse componente.

A reação de hidrólise da lactose apresenta como produtos os monossacarídeos glicose e galactose e, esta reação pode ser catalisada por ácidos ou enzimas. Na hidrólise ácida há ocorrência de reações paralelas complexas, enquanto que a hidrólise enzimática se mostra altamente seletiva e os produtos obtidos preservam as suas propriedades (LADERO et al., 2000). Essa hidrólise é catalisada pela enzima β -galactosidase, também conhecida popularmente como lactase.

As β -galactosidases podem ser encontradas na natureza, distribuídas entre vegetais, órgãos de animais e também são produzidas por uma enorme variedade de microrganismos, tais como fungos, leveduras e bactérias, sendo as leveduras e os fungos as fontes preferenciais desta enzima para aplicações comerciais (JURADO et al., 2002).

Assim, este estudo propõe uma revisão bibliográfica acerca dos processos de obtenção, aplicações e breve discussão de conceitos relacionados à hidrólise da lactose através da enzima β -galactosidase.

CAPÍTULO 2

OBJETIVOS

Considerando a importância da reação de hidrólise da lactose no processamento de produtos com teores reduzidos deste composto e das inúmeras fontes possíveis de obtenção da enzima responsável por essa reação, este trabalho se propõe a elaborar uma revisão bibliográfica dos conceitos associados à produção de β -galactosidase. Para que o objetivo proposto seja alcançado, foram estabelecidos alguns objetivos específicos:

- Discutir os tipos de reações de hidrólise da lactose;
- Realizar breve estudo dos processos de imobilização e recuperação enzimática;
- Estudar as aplicações e utilidades da β -galactosidase;
- Avaliar as propriedades das diferentes fontes de obtenção de β -galactosidase, especialmente fontes microbiológicas, através de trabalhos publicados por diversos autores;
- Realizar estudo comparativo entre as diferentes fontes de obtenção.

CAPÍTULO 3

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 LACTOSE

A lactose (4-O-β-D-galactopiranosil-D-glicose, nome IUPAC), com fórmula molecular $C_{12}H_{22}O_{11}$, é um dissacarídeo formado por monômeros de glicose e galactose unidos por uma ligação glicosídica β-1,4 (AMMAM e FRANSAER, 2010). É o carboidrato em maior quantidade no leite, apresentando baixo poder adoçante, enquanto que seus monômeros, individualmente, são capazes de propiciar maior doçura aos alimentos. A concentração de lactose no leite varia entre os mamíferos de 2,0 a 8,5%. No leite humano, a concentração pode chegar a 7,0% (FENNEMA, 2009).

Para a indústria de alimentos, a lactose apresenta propriedades físicas e químicas que podem ser desejáveis ou indesejáveis, conforme dados apresentados pela Tabela 1.

Tabela 1 – Propriedades da lactose relevantes na indústria de alimentos.

Desejáveis	Indesejáveis
Apresenta sabor neutro	Possui baixo poder adoçante
Acentua sabores naturais	Apresenta baixa solubilidade, causando cristalização
Molécula não higroscópica	Necessidade de hidrólise para absorção pelo organismo
Participa da reação de Maillard, desejável para produtos de panificação	
Auxilia na absorção de cálcio pelo intestino	
Aumenta a produção benéfica de ácido láctico no intestino	

Fonte: Adaptado de YANG e SILVA, 1995.

O realce do sabor em alguns produtos e a baixa higroscopicidade são consideradas propriedades vantajosas. Por outro lado, a sua baixa solubilidade pode acarretar problemas na textura de alguns alimentos.

Muitas aplicações podem ser propostas para a utilização da lactose, principalmente devido as suas características físico-químicas em relação a outros açúcares. Na indústria de alimentos pode ser utilizada na preparação de condimentos, de produtos para confeitarias, padarias e para uso como xarope (ZADOW, 1984). Para ser transformada em lactose grau farmacêutico, a lactose em pó é concentrada e parcialmente acidificada. Este concentrado deve ser tratado com carvão para a remoção de corantes, filtrado e, após passagem por cristalizador evaporativo, deve ser seco e moído. Para a produção de lactose farmacêutica, aspectos como a coloração da solução, o teor de proteínas, metais pesados, cálcio, sulfatos, cloretos e a presença de microrganismos são importantes e devem ser monitorados para garantir a qualidade e segurança do produto final (BRANDÃO, 1994).

Segundo Brandão (1994), a lactose pode ser utilizada como matéria-prima para diversos produtos, incluindo:

- Lactosilurea, preparada pela condensação da lactose e ureia e utilizada como alimento de ruminantes para a síntese de proteínas.
- Lactitol, adoçante sem valor nutritivo.
- Lactulase, isômero da lactose obtido pelo tratamento do açúcar do leite em meio alcalino. Seu uso está relacionado ao combate à constipação infantil e ao crescimento de *Bifidus bacterium bifidus* na flora intestinal.

Entretanto, um problema diretamente relacionado à presença do açúcar redutor lactose em produtos alimentícios é a intolerância a lactose apresentada por algumas pessoas, descrita como uma afecção da mucosa intestinal que incapacita a digestão da lactose pelo organismo devido à deficiência da enzima responsável pela hidrólise e consequente quebra da molécula em glicose e galactose (PEREIRA FILHO, 2004).

Relacionado a problemas na esfera ambiental, a lactose presente no soro de leite dos efluentes da indústria de laticínios requer elevada DBO (Demanda Bioquímica de Oxigênio), cerca de 100 vezes maior que a requerida pelo esgoto doméstico (ALENCAR, 2011). Por isso, há uma busca por novas alternativas para o processamento da lactose presente no soro de leite como um passo crucial para que as indústrias possam respeitar as legislações ambientais referentes ao tratamento e descarte de resíduos.

Diante disso, são elevados os interesses na redução dos teores de lactose em alimentos processados, bem como a diminuição de sua concentração nos efluentes das indústrias. A alternativa para isso é a hidrólise da lactose pela quebra da ligação glicosídica β -1,4, resultando em glicose e galactose como produtos da reação. No organismo, a glicose é utilizada como fonte de energia e a galactose é metabolizada no fígado em glicose e também passa a ser utilizada como fonte de energia, ou ainda, pode ser eliminada pela urina (MATTAR e MAZO, 2010). Além disso, a hidrólise da lactose também é importante para a obtenção de outras melhorias tecnológicas em derivados lácteos dentro da indústria de alimentos, como a melhor solubilidade e redução da incidência de cristalização em sorvetes, doce de leite e leite condensado, além de melhorias nas características sensoriais, tais como o incremento no poder adoçante, implicando em menor adição de sacarose e consequente redução no teor calórico (JURADO et al., 2002).

3.2 REAÇÃO DE HIDRÓLISE DA LACTOSE

A lactose é um dissacarídeo que ao sofrer hidrólise, forma como produtos glicose e galactose. Esses dois monossacarídeos são unidos por uma ligação entre o carbono-1 da galactose e o carbono-4 da glicose (ZADOW, 1984).

As estruturas da lactose, galactose e glicose estão representadas na Figura 1.

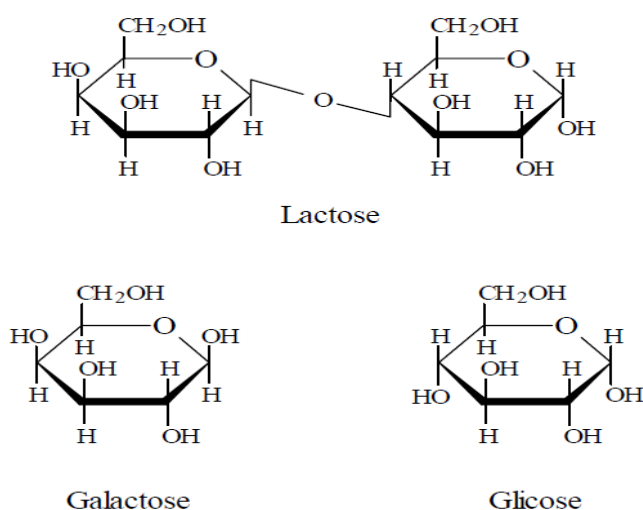


Figura 1 – Estrutura das moléculas de lactose, galactose e glicose (ZADOW, 1984).

A hidrólise da lactose pode ocorrer de duas maneiras principais: por via ácida ou enzimática. A reação é rápida quando se usam ácidos como catalisadores. A temperatura da reação no tratamento ácido é muito maior que no enzimático (150 °C e 30 – 40 °C, respectivamente), entretanto, os produtos adquirem coloração e odor que impedem sua utilização direta pela indústria de alimentos. Por outro lado, a hidrólise enzimática pode ser aplicada no leite ou no soro do leite sem a necessidade de tratamento prévio e assim, os produtos obtidos têm suas propriedades físico-químicas preservadas. Além disso, o uso de enzimas permite condições mais moderadas de temperatura e pH e não causa problemas nos produtos obtidos, como por exemplo a desnaturação das proteínas presentes na solução de lactose, a obtenção de uma solução de coloração amarronzada e a obtenção de subprodutos indesejáveis, comuns pelo meio ácido. Assim, para aplicações no setor de alimentos, o método mais recomendável é o enzimático (CARMINATTI, 2001). A Figura 2 mostra de forma esquemática as duas vias principais do processo de hidrólise da lactose.

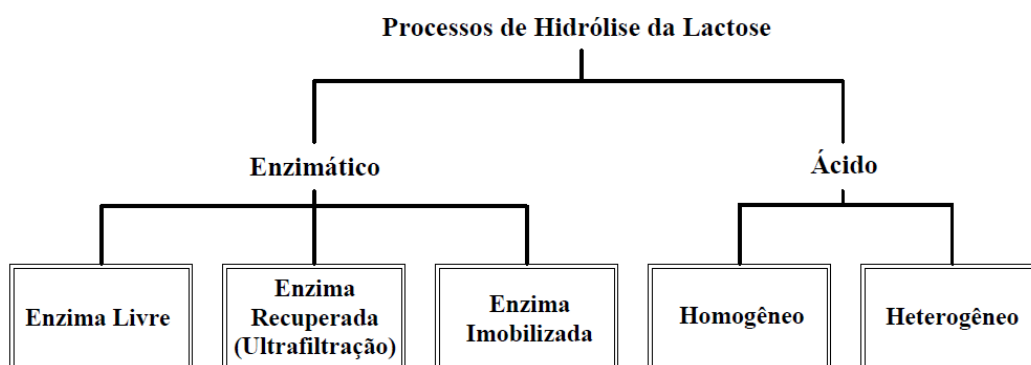


Figura 2 – Processos de hidrólise da lactose (HOBMAN, 1984).

Conforme dito, em princípio, a reação de hidrólise da lactose forma uma mistura isomolecular de glicose e galactose. Na prática, dependendo das condições em que ocorra a reação, a mistura isomolecular não é alcançada, pois a galactose formada pode sofrer polimerização ou se unir à lactose formando oligossacarídeos (GEKAS e LÓPEZ-LEIVA, 1985).

3.2.1 Hidrólise Ácida

A hidrólise ácida requer elevadas concentrações de ácidos (pH 1,0 – 2,0) e altas temperaturas (até 150 °C). Não é utilizada na indústria de alimentos, pois subprodutos indesejados são formados ao final da reação. Seu uso está mais relacionado à formação de um hidrolisado que atua como substrato fonte de carbono, para produção de etanol por microrganismos (HATZINIKOLAOU et al., 2005).

A hidrólise ácida em fase homogênea (fase única) utiliza íons hidrogênio em solução (pH 1,0 a 1,5) para catalisar a hidrólise da lactose durante tratamento térmico (24 h a 60 °C ou 11 minutos a 140 °C). Já o processo heterogêneo (duas fases) utiliza uma resina de troca catiônica onde os íon H^+ estão ligados. O processo heterogêneo é o mais utilizado devido à possibilidade de regeneração da resina de troca catiônica (HOBMAN, 1984).

Na hidrólise ácida, um alto grau de conversão é obtido em um reduzido espaço de tempo sob condições severas. Um exemplo é a obtenção de 80% de hidrólise em 3 minutos sob pH 1,2 e 150 °C. Durante este período, uma coloração marrom é formada, sendo necessária uma posterior etapa de clarificação utilizando-se, por exemplo, carvão ativo (HOBMAN, 1984).

Para GEKAS e LÓPEZ-LEIVA (1985), as desvantagens da hidrólise ácida são:

- Impossibilidade de aplicação na hidrólise do leite ou em soluções contendo proteínas, pois altas temperaturas e pH ácido provocam a desnaturação dos complexos proteicos;
- A presença de sais no soro do leite causa a desativação do ácido, fazendo-se necessária a desmineralização do soro (retirada de até 95% dos sais);
- Aparecimento de coloração marrom implica na necessidade de processos descolorantes;
- Formação de subprodutos indesejáveis;
- Alto custo de aquisição de materiais para a construção da planta devido aos agentes químicos extremamente agressivos.

3.2.2 Hidrólise Enzimática

A hidrólise enzimática da lactose é mais utilizada e estudada pela indústria de alimentos e a enzima responsável por esta reação é a enzima β -galactosidase. Esta reação pode ser realizada em condições mais brandas de temperatura e pH e não causa problemas nos produtos obtidos, como a desnaturação das proteínas presentes na solução de lactose, o aparecimento de coloração marrom, o que pode implicar na necessidade de ações descolorantes, e o surgimento de subprodutos indesejáveis, comuns nos métodos ácidos. Portanto, para aplicações na indústria de alimentos, o método enzimático se mostra mais recomendável.

Muitos sistemas enzimáticos para hidrólise da lactose podem ser utilizados para as enzimas tanto em sua forma livre quanto em sua forma imobilizada (FREITAS, 2007). O importante é que haja uma relação favorável entre o custo da enzima e o rendimento da hidrólise.

A hidrólise enzimática da lactose é um processo complexo que envolve uma grande quantidade de reações sequenciais, formando sacarídeos como produtos intermediários. Durante a reação, outros açúcares, além da glicose e galactose, são formados, dependendo da origem da β -galactosidase utilizada (PRENOSIL et al., 1987).

Com o desenvolvimento de lactases comerciais, houve uma grande melhoria nas técnicas empregadas na hidrólise enzimática. A enzima pode ser utilizada de duas maneiras: em batelada (“single use”) ou imobilizada. Nos processos em batelada, a enzima adicionada no início do processo de hidrólise é perdida quando o hidrolisado é pasteurizado. No processo de imobilização, a enzima é fixada fisicamente ou quimicamente a um suporte sólido, de modo a impedir sua livre circulação (FREITAS, 2007).

Não há muitos trabalhos publicados que descrevem o processo de hidrólise em batelada (enzimas livres), pois se trata de um processo inviável comercialmente devido aos altos custos referentes à aquisição de enzimas, aos efeitos da temperatura, pH e quantidade de sais envolvidos no processo que tornam a técnica pouca aplicada (ZADOW, 1984).

3.2.3 Formação de Galactooligossacarídeos (GOS)

Oligossacarídeos são açúcares encontrados como componentes naturais em alimentos como frutas, vegetais, leite e mel, podendo ser sintetizados enzimaticamente via biotecnológica. Muitos destes oligossacarídeos apresentam característica prebiótica, proporcionando efeito positivo na composição da microbiota intestinal, sendo resistentes às ações das enzimas salivares e intestinais (FAI e PASTORE, 2015).

Dentre os oligossacarídeos encontram-se os galactooligossacarídeos (GOS), produzidos a partir da lactose através de uma reação enzimática com β -galactosidase conhecida como transgalactosilação (CHEN et al., 2002). Os açúcares obtidos desta reação são a glicose, a galactose e os galactooligossacarídeos. Convém mencionar que outro tipo de oligossacarídeo não digerível e que não sofre transgalactosilação também pode ser formado a partir da lactose por síntese química: a lactulose é um dissacarídeo composto por uma molécula de galactose e outra de frutose, unidas por ligação do tipo β -1,4 e resulta de um processo álcali de isomerização da lactose, na qual a galactose é isomerizada a um resíduo de frutose (AIT-AISSA e AIDER, 2014).

Os GOS são compostos por moléculas de galactose ligadas à lactose, sendo formados de tri a hexassacarídeos com 2 a 5 unidades de galactose (SAKO et al., 1999). São polímeros unidos por ligações glicosídicas e a quantidade de GOS formados é dependente da fonte das enzimas, do tempo de reação e da concentração inicial de lactose (LÓPEZ-LEIVA e GUZMAN, 1995).

Dependendo da lactase utilizada, existem grandes diferenças entre a quantidade, tamanho e tipo de galactooligossacarídeos formados. A lactase obtida de *Bacillus circulans* produz diversos GOS em grandes quantidades, enquanto que as extraídas de *Kluyveromyces sp* produzem principalmente trissacarídeos (FAI e PASTORE, 2015).

A conversão da lactose em GOS por ação da enzima β -galactosidase é uma reação cineticamente controlada e responde a um modelo de competição entre a reação de transgalactosilação e hidrólise. A relação entre a concentração inicial de lactose e a quantidade de GOS formada em um sistema, é constatada, na maioria dos estudos, como diretamente proporcional, pois esta elevaria a quantidade de sacarídeos no meio e diminuiria a

disponibilidade de água, diminuindo assim a seletividade da hidrólise (FAI e PASTORE, 2015).

Os GOS são classificados como prebióticos, porque além de não serem hidrolisados e nem absorvidos na parte superior do trato intestinal, promovem de forma seletiva o crescimento e/ou estimulam a atividade metabólica de bactérias benéficas à saúde, sendo o crescimento de bifidobactérias do tipo *Lactobacillus bifidus* considerado o principal objetivo dos prebióticos (SANTOS, 2002). Os efeitos dessa bífido bactéria no corpo humano incluem a recuperação da flora intestinal após tratamento com antibióticos até a produção de vitaminas e outros compostos utilizados no trato intestinal, além de aumentar a tolerância à lactose, possuir atividade anticancerígena, estimular o sistema imunológico e melhorar o valor nutricional dos alimentos (MICHELON et al., 2014).

Os galactooligossacarídeos podem ser usados como adoçantes, em produtos de leite fermentado, pães, geleias, bebidas e produtos de confeitaria. O pão é um alimento apropriado para a inclusão destes. Pois durante a fermentação com a levedura e o cozimento, os GOS não sofrem degradação e auxiliam no sabor e textura do produto. Outros bons exemplos de produtos com adição de GOS são os fermentados de laticínios (MARTINS e BURKERT, 2009).

A Figura 3 esquematiza um processo industrial para a produção de GOS. A lactose utilizada como substrato na reação é geralmente purificada de soro de leite de vaca. Os principais produtos são trissacarídeos e poucos oligossacarídeos, além de grande quantidade de dissacarídeos transgalactosilados (LISBOA, 2009).

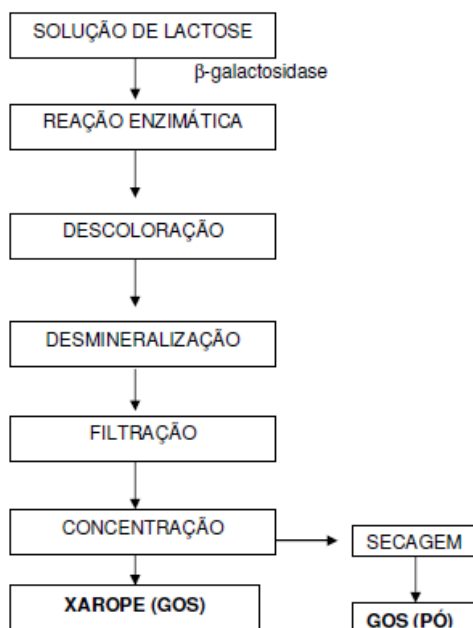


Figura 3 – Processo de produção industrial de galactooligossacarídeos (LISBOA, 2009).

Prenosil e colaboradores (1987) utilizaram β -galactosidases extraídas de fungos *Aspergillus niger* e *Aspergillus oryzae* e de leveduras para comparar a produção de oligossacarídeos na hidrólise enzimática da lactose. Os resultados obtidos mostraram que a lactase obtida de *A. oryzae* é a que fornece maior quantidade de polissacarídeos, especificamente trissacarídeos e tetrassacarídeos.

Em relação ao efeito da temperatura na síntese de galactooligossacarídeos, Santos (2006), realizou testes com β -galactosidase de *Scopulariopsis sp* à 35, 45 e 60°C. Quando a temperatura do sistema de reação era de 35°C não houve produção de GOS, a 45°C verificou-se a produção de GOS em todos os tempos do experimento e finalmente à 60°C não houve produção de GOS, observando-se que temperaturas elevadas desfavorecem a transgalactosilação.

Lisboa e colaboradores (2009) estudaram a síntese de galactooligossacarídeos via reação enzimática de β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* utilizando como substrato lactose. Para o estudo da síntese enzimática variaram a concentração de lactose de 200 a 400 mg.mL⁻¹ e concentração de enzima de 5 a 10 U.mL⁻¹ a 30°C. Nessa condição, a conversão de lactose a GOS foi de 65%. Além disso, observaram que a maior concentração de lactose foi favorável ao mecanismo de transgalactosilação, enquanto que, em menores concentrações, o mecanismo hidrolítico predominou.

3.2.4 Cinética da Hidrólise da Lactose

A hidrólise da lactose tem sido modelada por diversos autores utilizando enzimas provenientes de bactérias, leveduras e fungos. Em geral, a modelagem se baseia na equação de Michaelis-Menten, que fornece a relação entre a velocidade da reação de hidrólise do substrato e a concentração do substrato limitante.

O modelo cinético geralmente utilizado para descrever a hidrólise enzimática da lactose é a equação de Michaelis-Menten com inibição competitiva por produto – galactose, representada pela Equação 1. (YANG e OKOS, 1989).

$$V = \frac{V_m \cdot C_S}{C_S + K_m \cdot \left(1 + \frac{C_P}{K_I}\right)} \quad (1)$$

Os parâmetros da Equação 1 são:

V= Velocidade de hidrólise ($\mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)

V_m = Velocidade máxima de hidrólise ($\mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)

C_S = Concentração do substrato ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)

C_P = Concentração do produto ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)

K_m = Constante de Michaelis-Menten ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)

K_I = Constante de inibição ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)

Os parâmetros V_m e K_m caracterizam as reações enzimáticas que são descritas pela cinética de Michaelis-Menten. V_m é dependente da concentração total da enzima, enquanto K_m é independente (FOGLER, 1992).

Na Tabela 2 são apresentados os parâmetros cinéticos obtidos por alguns autores para a enzima β -galactosidase obtida de diversas fontes na forma solúvel e insolúvel sob diversas condições de temperatura.

Analisando os dados da Tabela 2, verifica-se a existência de uma ampla diferença entre os valores de K_m e V_m . Isto se deve principalmente a fatores como solubilidade, método de imobilização, tipo de suporte, concentração inicial da enzima e condições de operação (temperatura, pH, fluxo) que podem afetar significativamente a atividade da enzima. Além disso, cada enzima apresenta K_m característico para um dado substrato e este parâmetro é muitas vezes usado para demonstrar a força de ligação de um substrato à enzima, ou seja, enzimas obtidas de diferentes fontes apresentarão distintos valores para K_m .

Tabela 2 – Parâmetros cinéticos obtidos utilizando a enzima β -galactosidase.

Fonte	T (°C)	Parâmetros cinéticos		Referência
		V_m ($\mu\text{mol.mg}^{-1}.\text{min}^{-1}$)	K_m (mmol.L ⁻¹)	
<i>Aspergillus oryzae</i>	25	0,71	35,3	GUIDINI et al., 2011
<i>Lactobacillus plantarum</i>	50	10,88	23,3	SELVARAJAN et al., 2015
<i>Aspergillus niger</i>	40	383	70,5	YANG e OKOS, 1989
<i>Kluyveromyces lactis</i>	37	123	17,3	CAVAILE e COMBES, 1995
<i>Escherichia coli</i>	21	570	0,23	HENG e GLATZ, 1994
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	40	580	23	SANTOS et al., 2002
<i>Aspergillus oryzae</i>	35	2,56	52,3	FREITAS et al., 2011

3.3 ENZIMAS

As enzimas são biocatalisadores de natureza proteica ou glicoproteica, com atividade intra ou extracelular, e apresentam como função o aumento da taxa de uma reação bioquímica, através da redução da energia de ativação, sem alterar o equilíbrio da reação (DEVLIN, 2008). Com enzimas, a catálise é realizada em condições brandas e na maioria das vezes em soluções aquosas a pressões e temperaturas amenas, além disso, as enzimas apresentam alto grau de especificidade em relação ao substrato.

As enzimas utilizadas nos setores industriais são quase em sua totalidade produzidas por microrganismos. A tecnologia enzimática surgiu como área de investigação durante a década de 60, com a imobilização de enzimas para uso em processos químicos (KRAJEWSKA, 2004).

O uso de enzimas se torna interessante quando permite que pequenas quantidades sejam suficientes para catalisar reações específicas devido a sua grande eficiência em condições moderadas. Sua alta seletividade faz com que as enzimas sejam extremamente úteis em processos envolvendo oxidações, condensações ou hidrólises, principalmente se o produto final possuir fins alimentícios (VIEIRA, 2009).

O poder catalítico e seletividade das enzimas dependem da manutenção de estruturas e propriedades tais como pH, temperatura e solventes hidrofóbicos que podem causar a inativação da enzima.

As enzimas foram classificadas pela União Internacional de Bioquímica e organizadas em seis classes distintas, de acordo com a natureza da reação catalisada (DEVLIN, 2008):

- Oxirredutases: catalisam as reações de oxirredução;
- Transferases: catalisam a transferência de grupos químicos de uma molécula para outra;
- Hidrolases: catalisam as reações de hidrólise, onde ocorre a adição da molécula de água a uma ligação química;
- Liases: catalisam a separação de ligações entre carbonos;
- Isomerases: catalisam rearranjos estruturais de moléculas;

- Ligases ou sintetases: catalisam a formação de novas ligações, mas precisam de energia, logo há consumo de ATP.

A atividade de uma enzima é altamente dependente de fatores e condições sob as quais uma reação ocorre, como por exemplo, temperatura e pH.

A temperatura é um fator relevante na velocidade da maioria das reações químicas, pois em baixas temperaturas observa-se uma menor agitação das moléculas e consequentemente, uma insuficiente energia de ativação para a ocorrência de uma reação. No entanto, em reações que envolvem enzimas, o aumento da temperatura pode apresentar efeito inverso quanto à velocidade de reação, podendo levar à desnaturação enzimática. Assim, a elevação da temperatura para melhor atividade das enzimas é limitada pela estabilidade da proteína (KIELING, 2002). A estabilidade térmica das enzimas influencia sua aplicação em processos biotecnológicos e sua utilização industrial.

A concentração de íon hidrogênio (H^+) está relacionada à estrutura tridimensional da enzima e sabe-se que uma diminuição na concentração desses íons, ou seja, uma diminuição do pH, pode alterar a estrutura das enzimas e levar à desnaturação das mesmas. Assim, há um pH no qual se observa a melhor condição de atividade catalítica das enzimas, chamado pH ótimo (KIELING, 2002).

3.3.1 Imobilização Enzimática

Os principais problemas da utilização de enzimas solúveis são o alto custo de produção e purificação, a instabilidade da estrutura tridimensional quando isoladas do seu ambiente natural e a perda de atividade devido às condições do processo ou inibição pelo substrato ou produto. Isto resulta em um tempo de meia-vida operacional curto e, consequentemente, um custo elevado. Além disso, muitas enzimas atuam na forma solúvel em meio aquoso (catálise homogênea), na qual contaminam o produto desejado e não podem ser recuperadas do meio reacional na forma ativa (KRAJEWSKA, 2004).

Um dos meios de se evitar a perda da enzima é a utilização de reatores com membrana, através dos quais é possível o processo de ultrafiltração para separar a enzima, por exemplo, a β -galactosidase, dos produtos de baixa massa molecular formados na hidrólise. As vantagens desse método são a utilização de enzimas em sua forma livre com possibilidade de

reutilização das mesmas e menor inibição da reação pelos produtos formados, uma vez que são retirados continuamente do reator. A desvantagem é a necessidade de dois processos: hidrólise da lactose e separação dos produtos (GEKAS e LÓPEZ-LEIVA, 1985).

Outro processo que permite a recuperação e reutilização de enzimas é o processo de imobilização, um termo genérico empregado para descrever a retenção de uma biomolécula no interior de um reator ou de um sistema. No caso das enzimas, a imobilização consiste no confinamento da proteína em um suporte sólido insolúvel em meio aquoso e em solventes orgânicos, e pode ser usada isolada ou em combinação com outras técnicas de estabilização de proteínas, considerada uma das ferramentas mais eficientes para alterar a especificidade, seletividade, atividade e estabilidade das enzimas. Em comparação com as enzimas solúveis, as enzimas imobilizadas são mais robustas e mais resistentes a mudanças do ambiente reacional, incluindo influências de temperatura, pH e solventes orgânicos (MENDES, 2011). Outras importantes vantagens das enzimas imobilizadas em comparação com as enzimas solúveis são a possibilidade de reutilização do biocatalisador, a facilidade de separação do catalisador e do produto da reação e de interrupção da reação, quando se atinge um determinado grau de conversão, além da possibilidade de conduzir processos contínuos.

Entretanto, dependendo da relação entre o custo do suporte e a estabilidade do derivado imobilizado, a imobilização, ao invés de reduzir o custo de um determinado processo, pode torná-lo ainda mais oneroso.

Devido às diferentes características e composições químicas das enzimas, diferentes propriedades do substrato e do produto e a finalidade de aplicação do produto final obtido, não há um método único aplicável na imobilização de enzimas. Assim, para cada aplicação de enzima imobilizada, é necessário escolher o procedimento mais simples e de menor custo que resulte numa imobilização com boa retenção de atividade e alta estabilidade operacional (BASSETTI, 1995).

Bassetti (1995) cita algumas vantagens da utilização de enzimas imobilizadas:

- Uso da mesma enzima por um período de tempo maior.
- Processos operados continuamente e de fácil controle.
- Facilidade na separação do produto final.
- Condições de operação mais brandas.
- Facilidade de interrupção da reação.
- Maior estabilidade ao pH e temperatura.

Após a imobilização, a atividade da enzima pode ser reduzida, sendo necessários cuidados especiais para evitar a contaminação, que pode provocar a sua perda (LÓPEZ-LEIVA e GUZMAN, 1995).

Os principais componentes de um sistema de enzimas imobilizadas são: a enzima, o suporte e o modo de ligação ao suporte. Como componentes adicionais que contribuem para o melhor desempenho da enzima, e devem ser levados em consideração na avaliação do sistema, tem-se: pH, temperatura, força iônica, pressão, agitação, liberação do substrato com a remoção dos produtos. Estes fatores influenciam no desempenho do suporte e, portanto, afetam o comportamento da enzima. O material do suporte deve ser efetivamente inerte, conter um grande número de sítios para a imobilização da enzima e impor a menor quantidade de limitações para a ocorrência da reação. Os suportes mais utilizados para a imobilização das enzimas incluem vidro poroso, resinas de troca iônica, poliacrilamida e colágeno (BASSETTI, 1995).

A estabilidade da enzima apresenta melhora significativa quando se emprega uma técnica adequada de imobilização. No caso das β -galactosidasas, existem vários procedimentos de imobilização: fixação ou união a suportes porosos por adsorção, interação iônica, afinidade, formação de complexos com metais (quelacão) e formação de ligações covalentes (LADERO et al., 2000).

A Figura 4 ilustra métodos de imobilização enzimática.

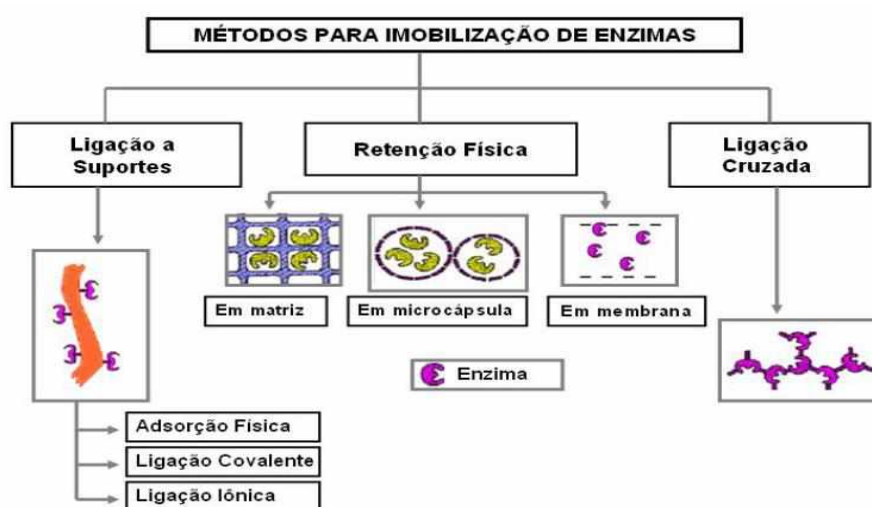


Figura 4 – Métodos de imobilização de enzimas (FISCHER, 2010).

A Tabela 3 apresenta as principais vantagens e desvantagens de algumas técnicas de imobilização.

Tabela 3 – Comparação entre técnicas de imobilização.

Técnica	Vantagens	Desvantagens
Adsorção física	Simple e barata Reagentes químicos não são necessários Baixa probabilidade de desnaturação das enzimas	Pode ocorrer desorção devido à ligação fraca O suporte tende a absorver outras espécies, como proteínas
Adsorção + ligação cruzada	A desvantagem da adsorção simples é evitada	Não é tão simples como a adsorção São utilizados reagentes químicos
Ligação covalente	Ligação muito forte Enzimas não se soltam do suporte	Utilização de reagentes químicos não aceitos no processamento de alimentos
Fixação em gel	Poucas alterações nas propriedades catalíticas Grande quantidade de células podem ser imobilizadas Reagentes químicos não são necessários	Limitações difusionais Limitada a substratos de baixa massa molecular
Fixação em fibras	Enzima extremamente estável	Baixo rendimento Fenômeno controlado pela difusão nos poros

Fonte: GEKAS e LÓPEZ-LEIVA, 1985.

3.4 β -GALACTOSIDASE

Lactase é o nome popularmente utilizado para a enzima β -galactosidase (E.C.3.2.1.23). As β -galactosidases foram descritas pela primeira vez em 1889 pelo professor Martinus Beijerinck, membro do Departamento de Microbiologia da Universidade de Delft. Nesse período, Beijerinck notou que algumas leveduras do gênero *Saccharomyces* apresentavam capacidade de fermentação da lactose em monossacarídeos. Mesmo em condições rudimentares e sem muitos recursos, ele foi capaz de precipitar e isolar as enzimas das culturas de leveduras, e por mais de 30 anos desenvolveu estudos que se tornaram fundamentais para a microbiologia e enzimologia moderna (GODOY, 2016).

A β -galactosidase é classificada como uma hidrolase com capacidade de transferase para grupos galactosila. A β -galactosidase possui duas atividades catalíticas. Primeiramente a β -galactosidase catalisa o resíduo terminal β -galactopiranosil da lactose (Gal β 1-4 glc) para formar glicose e galactose, enriquecendo o produto hidrolisado com galactooligossacarídeos. Depois a enzima converte a lactose em outro dissacarídeo, a alolactose. A enzima é bastante específica para o açúcar na posição galactosil, mas é habilitada para hidrolisar β -D-galactopiranosídeos com uma ampla variedade de aglicona. Por essa particularidade, a alolactose é finalmente convertida pela enzima em glicose e galactose (MORTOZA, 2012). A Figura 5 mostra a atividade catalítica da β -galactosidase sobre a molécula de lactose.

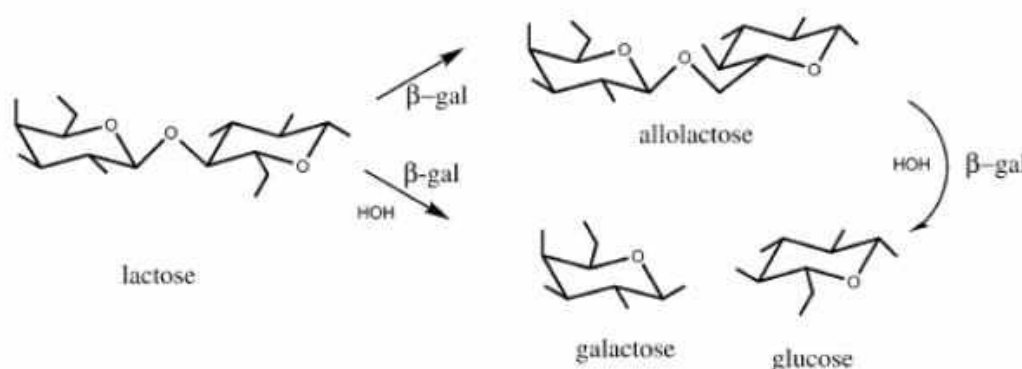


Figura 5 – Esquema representativo da atividade catalítica da β -galactosidase frente à molécula de lactose (MATTHEWS, 2005).

As β -galactosidases são encontradas na natureza, distribuídas entre vegetais, animais e microrganismos, e assim, suas características variam de acordo com sua origem (LADERO et al., 2000). A β -galactosidase pode ser encontrada em amêndoas, pêssegos, damascos e maçãs, assim como em alguns órgãos de animais como intestino, cérebro e placenta. Porém, a extração da β -galactosidase destas fontes apresenta alto custo e baixo rendimento, por apresentarem baixa concentração da enzima. Desta forma, a β -galactosidase é obtida principalmente a partir de microrganismos, especialmente fungos filamentosos, leveduras e bactérias.

A preferência das indústrias é por microrganismos que não tragam riscos à saúde, portanto, tendem a utilizar espécies classificadas pelo departamento do governo dos Estados Unidos FDA (Food and Drug Administration) como GRAS (Generally Recognized As Safe – geralmente conhecidos como seguros) e de acordo com a União Européia, Q.P.S (Qualified Presumption of Safety) (LANE e MORRISSEY, 2010).

As propriedades das β -galactosidases dependem de diversos fatores e variam de acordo com o microrganismo fonte. A lactose é o substrato natural mais utilizado para a ação dessas enzimas.

A β -galactosidase teve a sua estrutura determinada primeiramente, como um cristal monocíclico com quatro tetrâmeros independentes em uma unidade assimétrica (MATTHEWS, 2005). Outra forma de cristal foi identificada, esse era formado por um único tetrâmero em uma unidade assimétrica (JUERS et al., 2000). Os tetrâmeros da β -galactosidase são compostos por quatro cadeias de polipeptídeos, cada uma contendo 1023 aminoácidos (FOWLER et al., 1978).

3.4.1 Aplicações de β -Galactosidases

Os mamíferos em geral são animais relativamente dependentes da produção de β -galactosidase no intestino. A ausência desta enzima implica na não digestão da lactose consumida e, neste sentido, a enzima β -galactosidase desperta grande interesse à saúde humana.

A ingestão oral direta da β -galactosidase por pessoas intolerantes a lactose é uma forma diferente de aplicação da β -galactosidase, visando à remoção da lactose do leite e seus

derivados. A vantagem deste método é a flexibilidade: não é necessária a hidrólise da lactose no produto e não há nenhuma demora na hidrólise em nível intestinal (SUÁREZ, 1987). A β -galactosidase derivada de *Aspergillus oryzae*, oralmente administrada, foi efetiva na prevenção da má absorção da lactose em crianças. Existe uma variedade para administração oral, entretanto, o tratamento não é indicado para os indivíduos que ingerem a lactose equivalente a um copo de leite ou menos por refeição (MORIWAKI, 2010). O uso da β -galactosidase, produzida através de microrganismos, como suplemento digestivo, vem sendo estudado, mas ainda é necessário mais pesquisas para que se obtenha um produto totalmente seguro e eficaz (MORTOZA, 2012).

Além da ingestão da β -galactosidase, esta enzima vem sendo aplicada na indústria de laticínios para hidrolisar a lactose do leite obtendo-se assim, alimentos com baixos teores de lactose, melhorando a solubilidade e digestibilidade do leite e derivados lácteos, ideais para consumidores intolerantes à lactose (SANTIAGO et al., 2004). A preocupação com uma alimentação com efeitos benéficos para a saúde tem aumentado a demanda por produtos alimentícios com essas características, dando suporte a novas pesquisas na área.

Conforme já citado anteriormente, existem duas formas de se fazer a hidrólise da lactose: hidrólise ácida ou enzimática. Quando se utiliza ácidos como catalisadores, a reação é extremamente rápida. A temperatura no tratamento ácido é bem maior que no enzimático (150°C e 30°C, respectivamente), mas os produtos adquirem coloração e odor que impedem a sua utilização direta com alimentos. A hidrólise enzimática pode ser aplicada no leite ou soro sem um tratamento prévio e os produtos obtidos preservam as suas propriedades aumentando o seu poder adoçante relativo (LADERO et al., 2000).

Em um estudo baseado no fato de que a hidrólise da lactose promove uma redução no ponto de congelamento, aperfeiçoou-se a utilização do soro em produtos congelados derivados do leite. O tratamento com β -galactosidase de sorvetes, leite gelado, leite batido e sobremesas resfriadas de baixa caloria contendo soro, resultou em produtos com boas características físicas e qualidade organoléptica. Segundo esse mesmo estudo, a β -galactosidase reduz o problema associado com a cristalização da lactose, aumenta a doçura e permite a redução da sacarose nas formulações e pode melhorar as características de qualidade, tal como consistência (KLEIN, 2010).

Além do leite, uma das principais fontes de lactose é o soro do leite, subproduto fundamental na fabricação de queijos. Cerca de 9 litros de soro de leite são gerados durante a fabricação de 1 kg de queijo. Tendo assim, cerca de 160 milhões de toneladas de soro de leite

produzidas no mundo anualmente. A indústria de laticínios tem problemas com o excesso de soro produzido e a forma como este deve ser descartado. O desenvolvimento de novos produtos e a expansão do mercado da lactose do soro, bem como a tecnologia que possibilite o processamento econômico do soro e fabricação de produtos com lactose hidrolisada, são essenciais para converter os gastos no tratamento destes resíduos em produtos benéficos para a indústria de derivados do leite (MORIWAKI e MATIOLI, 2010). Cepas de *Saccharomyces cerevisiae* podem ser usadas para produção de etanol a partir do soro de queijo hidrolisado, tendo aplicação não só na indústria de alimentos (ZADOW, 1984).

Outra utilidade da β -galactosidase vem sendo ressaltada por sua propriedade de gerar derivados de lactose através da transgalactosilação para formação de galactooligosacarídeos (GOS), considerados alimentos funcionais. Por não serem digeridos, os GOS podem alcançar a microbiota do cólon e promover a proliferação de bifidobactérias, o que faz deles importantes aditivos em fórmulas infantis e em outros produtos lácteos (RUBIO, 2006).

A β -galactosidase pode ser aplicada na indústria de duas formas: como “free enzyme”, enzima em solução, ou como uma enzima imobilizada em biorreator (GANZLE et al., 2008). A abordagem “free enzyme” é uma técnica simples, mas a enzima solúvel dificilmente pode ser reutilizada, o que representa uma desvantagem, pois eleva os custos das preparações enzimáticas. No entanto, tecnologias de membranas, a maioria baseadas em membranas de ultrafiltração, tem sido exploradas para a recuperação e reutilização da enzima solúvel. A tecnologia de imobilização em biorreator proporciona a reciclagem da enzima e a possibilidade de operação contínua, e pode em alguns casos resultar em maior estabilidade da enzima. A principal desvantagem é a pouca permeabilidade das membranas celulares à lactose, embora a permeabilidade das células microbianas possa ser aumentada através de tratamentos com agentes químicos, detergentes ou solventes (OLIVEIRA, 2005).

3.5 FONTES DE OBTENÇÃO DA β -GALACTOSIDASE

Apesar da possibilidade de obtenção da β -galactosidase por diferentes fontes, tais como fontes vegetais e animais, os microrganismos são atualmente os principais meios de produção de β -galactosidases e da grande maioria das enzimas de uso comercial. Isso se deve ao fato de apresentarem um alto rendimento e custos relativamente não tão elevados quando

comparados com as tradicionais fontes de enzimas extraídas de animais e vegetais (KIRK et al., 2002).

Segundo REGULY (2000), a seleção ou escolha de um microrganismo apropriado é o primeiro e mais importante passo para a produção de enzimas. A escolha do microrganismo deve levar em consideração, entre outros fatores:

- A facilidade de cultivo, em substratos simples e econômicos;
- A estabilidade em suas características genéticas de produtor de determinada enzima;
- As exigências nutritivas;
- A facilidade de recuperação da enzima a partir do meio, pelos métodos de extração, concentração e purificação;
- A isenção de formação de produtos tóxicos;
- A aprovação pelos órgãos responsáveis, quando se trata de enzima para uso alimentício.

Nem todas as lactases são seguramente reconhecidas ou aceitas para utilização na indústria de alimentos. A enzima obtida de *Escherichia coli*, por exemplo, é a lactase mais conhecida a níveis estruturais e catalíticos, entretanto, não é recomendável para uso em processos alimentícios devido aos riscos de toxicidade associados aos extratos brutos de coliformes. Enzimas extraídas de *A. niger*, *A. oryzae* e *Saccharomyces sp* são consideradas seguras, devido ao histórico de suas aplicações e aos numerosos estudos já realizados (MORTOZA, 2012).

A Tabela 4 apresenta as principais fontes microbiológicas para obtenção da enzima β -galactosidase.

Tabela 4 – Possíveis fontes microbiológicas de obtenção de β -galactosidase.

LEVEDURAS	<i>Kluyveromyces sp</i>
	<i>Candida pseudotropicalis</i>
	<i>Saccharomyces sp</i>
BACTÉRIAS	<i>Escherichia coli</i>
	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>
	<i>Bacillus sp</i>
	<i>Streptococcus lactis</i>
FUNGOS	<i>Aspergillus oryzae</i>
	<i>Aspergillus niger</i>

Fonte: Modificado de FISCHER, 2010.

Como resultado das diferentes fontes de obtenção e dos distintos métodos de preparação comercial, as β -galactosidases apresentam diferenças importantes e significativas em várias de suas propriedades. A Tabela 5 apresenta algumas propriedades das enzimas lactases microbianas.

As propriedades das β -galactosidases dependem de diversos fatores e variam de acordo com o microrganismo produtor. A β -galactosidase extraída da *Escherichia coli* possui o maior peso molecular, enquanto os mais inferiores foram observados em enzimas extraídas de *Aspergillus niger* e *Kluyveromyces lactis*. A temperatura e o pH ótimos diferem de acordo com a fonte de obtenção de cada enzima e também de acordo com o método de preparação comercial. O método de imobilização da enzima e o tipo de suporte também podem influenciar as condições ótimas de operação (GEKAS e LÓPEZ-LEIVA, 1985). As enzimas com pH ótimo ácido e temperatura ótima relativamente alta são convenientes para a hidrólise de lactose em meio ácido. Comparada com a β -galactosidade de bactérias e leveduras, as fúngicas são proteínas relativamente pequenas, que não requerem íons metálicos para a estabilidade ou atividade, uma grande vantagem em processos alimentícios.

As enzimas de origem fúngicas, como *Aspergillus niger* e *Aspergillus oryzae* são relativamente pequenas, independentes de metais, são ativas quando em pH ácido e, portanto, utilizadas na maioria das vezes para hidrólise em ambientes ácidos. A β -galactosidase de *A. oryzae* é comparativamente mais barata, porém, é menos estável e com elevada atividade na síntese de oligossacarídeos (YANG e OKOS, 1989).

A lactase de *Kluyveromyces fragilis*, atualmente chamada *Kluyveromyces marxianus*, é uma enzima completamente dependente de metais como Mn^{+} , Mg^{+} e K^{+} . Os metais e as enzimas estão envolvidos em uma reação reversível que promove a formação de um complexo enzimático. Esse complexo enzima-íon metálico é 50% mais ativo do que a enzima sozinha (LADERO et al, 2000). Além disso, as enzimas de leveduras do gênero *Kluyveromyces* são ativas a pH neutro e, portanto, eficientes na hidrólise do leite e do soro doce. São menos estáveis quando comparadas às fúngicas e devem ser utilizadas somente em temperaturas moderadas.

Tabela 5 – Propriedades de algumas β -galactosidases microbianas.

Fonte	pH ótimo	pH estabilidade	Cofatores necessários	Temperatura ótima (°C)	Peso molecular (kDa)	Referência
<i>Aspergillus oryzae</i>	3 - 4	2,5 – 8	Nenhum	55 – 60	124	GEKAS e LÓPEZ- LEIVA, 1985
<i>Aspergillus niger</i>	4,5	3,5 – 8	Nenhum	50 – 55	90	GEKAS e LÓPEZ- LEIVA, 1985
<i>Kluyveromyces fragilis</i>	6,6	6,5 – 7,5	Mn^{+2} , K^{+}	37	201	MARIOTTI, 2000
<i>Kluyveromyces lactis</i>	6,9 - 7,3	7 – 7,5	Mn^{+2} , Na^{+}	35	135	MARIOTTI, 2000
<i>Escherichia coli</i>	7,2	6 – 8	Na^{+} , K^{+}	40	540	GEKAS e LÓPEZ- LEIVA, 1985
<i>Lactobacillus thermophilus</i>	6,2	-	-	55	540	GEKAS e LÓPEZ- LEIVA, 1985

Apesar dos extensos estudos e tecnologias empregadas para obtenção de β -galactosidases de diversas fontes, ainda existe grande procura por enzimas com propriedades

superiores, tais como melhor estabilidade térmica a pH neutro e boa atividade a baixas temperaturas. Algumas fontes originadas de microrganismos termófilos são muito interessantes em relação à termo estabilidade da enzima (FISCHER, 2010).

3.5.1 β -Galactosidases de Leveduras

As leveduras são fungos unicelulares, não-filamentosos, com parede celular rígida e de formato esférico ou oval (MARQUEZ *et al.*, 2005).

Ainda que possam ser obtidas por diversas fontes microbianas, as β -galactosidases de leveduras apresentam elevado potencial de uso, especialmente em escala industrial, uma vez que apresentam capacidade de crescimento a elevadas temperaturas resultando em uma maior conversão em menor tempo de residência. Com lactose como substrato, as leveduras do gênero *Kluyveromyces* apresentam vantagens quando comparadas às dos gêneros *Saccharomyces*, pois apresentam maiores níveis de crescimento e alta produtividade enzimática. Além disso, são parte da categoria de microrganismo de consumo humano seguro (LIMA, 2012).

Dentre as *Kluyveromyces* mais utilizadas para produção de enzimas lactases se destacam as espécies *K. lactis* e *K. marxianus*. Estas apresentam bastante similaridade genética, são cerca de 99% idênticas do ponto de vista de sequência dos genes (PEREIRA-RODRÍGUEZ *et al.*, 2012), e portanto, são utilizadas de forma semelhante com a mesma finalidade e sob as mesmas condições operacionais.

As linhagens de *Kluyveromyces marxianus* são isoladas a partir de variados *habitats*, fazendo com que apresentem diversidade metabólica, possibilitando uma vasta gama de aplicações biotecnológicas (FONSECA *et al.*, 2008). Além da produção enzimática, são amplamente utilizadas nos processos biotecnológicos para a produção de alimentos, bebidas, química fina, farmacêutica e de reagentes (WAITES *et al.*, 2001). Apresentam alta capacidade respiratória e grande afinidade com oxigênio. Outra característica que justifica o grande uso em escala industrial é seu crescimento a elevadas temperaturas (40°C), diminuindo-se assim os custos de resfriamento e os riscos de contaminação e altas velocidades de crescimento (FURLAN *et al.*, 1995).

As β -galactosidases provenientes de leveduras do gênero *Kluyveromyces* são intracelulares, e devido a essa natureza intracelular, a enzima necessita ser extraída da célula

da levedura pela ruptura ou permeabilização da mesma através de substâncias químicas e/ou tratamentos mecânicos. São induzidas por lactose e galactose e produzidas em sua maioria por cultivo submerso. Por apresentarem pH ótimo na região neutra, são bem adaptadas para hidrólise da lactose do leite. Entretanto, são fortemente inibidas pela alta concentração de cálcio no leite e pequenas concentrações de sódio. São também inibidas pela galactose (competitivamente) e glicose (não-competitiva) (LADERO et al., 2000).

Cada espécie de levedura apresenta um comportamento referente ao metabolismo de açúcares. Em *Saccharomyces cerevisiae*, por exemplo, a orientação metabólica a ser seguida depende da concentração inicial de açúcar no cultivo. Em *Kluyveromyces*, a escolha entre respiração e fermentação é controlada pelo nível de oxigenação do cultivo (SILVEIRA et al., 2005).

Fisiologicamente as leveduras podem ser classificadas quanto ao oxigênio como: aeróbias estritas, que necessitam de oxigênio para metabolizar carboidratos (DINIZ, 2009); facultativas, que crescem tanto na presença quanto na ausência de oxigênio; anaeróbias facultativas suportam até uma baixa concentração de oxigênio e anaeróbias estritas, não suportam oxigênio (BLANK et al., 2004). A *Kluyveromyces marxianus* é classificada como facultativa, sendo capaz de gerar energia tanto por respiração como por fermentação alcoólica, mas preferencialmente segue a respiração e só produz etanol em condições limitadas de oxigênio (LANE e MORRISSEY, 2010).

3.5.1.1 Estudos Referentes à β -Galactosidases de Leveduras

Ao longo dos anos, diversos estudos foram realizados e a literatura apresenta diversos trabalhos referentes à produção de β -galactosidases por leveduras.

Schneider e colaboradores, em 1996, estudaram *K.marxianus* CBD 002 para produção de β -galactosidase utilizando melaço de cana-de açúcar como substrato fonte de carbono. Observaram atividade enzimática desprezível em meio de cultivo apenas com melaço, entretanto, ao utilizarem melaço enriquecido com extrato de levedura e peptona, chegaram a altos índices de atividade da enzima.

Em 1999, Rech e colaboradores, utilizando soro de queijo como substrato, determinaram as condições ideais para crescimento das leveduras *K. marxianus* CBS 712 e *K.*

marxianus CBS 6556 objetivando a produção de β -galactosidase. Valores de pH e temperatura ideais de crescimento foram, respectivamente, 5,5 e 35-37 °C para ambos microrganismos. Para a cepa CBS 6556, o meio de cultura soro de queijo in natura (7% m/v) se mostrou ideal, enquanto para a cepa CBS 712, soro de queijo suplementado com extrato de levedura (1% m/v) apresentou melhores resultados. Por utilizar substrato mais simples e de menor custo, a levedura *K. marxianus* CBS 6556 foi submetida a testes de otimização do processo em soro de queijo concentrado (21% m/v), apresentando maior produção de β -galactosidase (800 U.mg⁻¹ de célula ou 10 U/mL).

Em 2003, Alejandra e colaboradores, produziram a enzima β -galactosidase de *K. lactis* empregando soro lácteo desproteínizado como substrato. O processo foi otimizado através do emprego da metodologia de superfície de resposta e durante os experimentos quatro fatores foram empregados para a determinação da atividade enzimática: temperatura, pH, velocidade de agitação e tempo de fermentação. Observaram que as melhores condições de operação foram temperatura de 30,3 °C, pH 4,68, agitação de 191 rpm e tempo de fermentação de 18,5 horas. Nessas condições a produção enzimática foi de 8,3 U/mL.

Também em 2003, Rajoka e colaboradores utilizaram diferentes substratos para a produção de β -galactosidase: lactose, galactose, celobiose, xilose, arabinose, sacarose e glicose em diferentes frascos sob agitação utilizando a levedura *K. marxianus*. O tipo de substrato e a temperatura de reação foram as variáveis de estudo para a avaliação do crescimento específico e taxa de produção enzimática. Lactose (2% m/v) apresentou maior rendimento na produção, seguida por galactose, sacarose, celobiose, xilose, arabinose e glicose. A temperatura de máxima produtividade foi de 35 °C.

Silva (2009) estudou a produção e purificação de β -galactosidase de *K. marxianus* CCT 7082 através de sistema aquoso bifásico (SAB). A produção da enzima se deu por fermentação submersa em frascos sob agitação de 180 rpm empregando lactose como fonte de carbono. O cultivo foi feito em incubadora rotatória a 30 °C durante 96 horas. A enzima β -galactosidase foi extraída através do rompimento das células da levedura. Para isso foram adicionadas 1,1 g de pérolas de vidro com diâmetro entre 0,6 e 0,8 mm, para cada mL de suspensão de células. A suspensão foi agitada em um vórtex por 40 min, e em seguida centrifugada a 6000 rpm durante 10 min a 4 °C. O sobrenadante, livre de células, foi utilizado para medida da atividade enzimática. A atividade enzimática foi determinada usando *o*-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo (ONPG) como substrato. No processo de purificação, o sistema era formado por polietilenoglicol (PEG) e tampão fosfato de potássio, utilizando-se

diversas massas molares do polietilenoglicol, variando o pH da enzima e do sistema em 6, 7 e 8. Foram testados diferentes pontos na região bifásica de cada sistema variando as concentrações de PEG e tampão fosfato de potássio. A enzima β -galactosidase apresentou comportamento distinto ao longo das variações de cada sistema obtendo o melhor resultado utilizando as concentrações 27% PEG 8000 e 10% sal no pH 8,0 atingindo fator de purificação de 10,1 vezes e recuperação de 175,2% na fase de fundo.

Scholz (2011) estudou a cinética de *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 a partir de fontes alternativas de carbono e nitrogênio visando à produção de β -galactosidase, avaliando o efeito das concentrações dos substratos, da temperatura e da agitação sobre o crescimento celular e a produção da enzima. Avaliou-se como fonte de carbono o soro de queijo oriundo da indústria de laticínios e como fontes de nitrogênio a água de maceração do milho, milhocina, e um extrato bruto de levedura. Os experimentos foram conduzidos em frascos de Erlenmeyer aletados de 1000 mL contendo 300 mL de meio de cultivo, por 24 h com agitação de 120, 180 ou 220 rpm, conforme o ensaio. As temperaturas avaliadas foram 30, 37 e 44 °C. Em paralelo observou-se a produção de etanol, em diferentes concentrações, de acordo com a agitação e a concentração inicial de lactose contida no soro de queijo. Observando as curvas de crescimento e os valores dos fatores de conversão, assim como os parâmetros significativos apontados no tratamento dos dados, conclui-se que o experimento contendo soro de queijo (125 mL/L) e milhocina (9 g/L) conduzidos em 44 °C e 220 rpm foi o mais indicado para a produção de β -galactosidase. E para o crescimento celular da levedura conclui-se que o experimento contendo soro de queijo (125 mL/L) e milhocina (3 g/L), em 30 °C e 220 rpm foi a melhor condição. A enzima produzida se mostrou estável nas temperaturas de 30 e 37 °C, sendo estas as melhores temperaturas para a atividade enzimática de β -galactosidase. A enzima apresentou-se estável durante 8 dias, quando armazenada de forma refrigerada e congelada e quanto ao pH, se mostrou estável em pH 6 e 7. Diante dos resultados, concluiu-se que as fontes alternativas de carbono e nitrogênio avaliadas foram satisfatórias para o crescimento de *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556, assim como para a produção da enzima β -galactosidase.

Al-jaizairi e colaboradores (2015) estudaram a influência de cinco parâmetros, incluindo a concentração inicial de açúcar, velocidade de agitação, pH inicial, tempo de incubação e a temperatura na otimização da produção de β -galactosidase em meio contendo lactose como fonte de carbono por *Kluyveromyces marxianus* DIYS11 e usando metodologia de superfície de resposta (RSM) como análise estatística. As condições ideais que indicaram a maior atividade enzimática foram a concentração de açúcar a 10%, velocidade de agitação de

250 rpm, pH 3, tempo de incubação de 64 horas e temperatura 20 °C, que gerou 4997 U/mL/min, o que indica *K. marxianus* DIYS11 um organismo promissor para a β -galactosidase industrial.

Erich e colaboradores (2015) com o intuito de obter uma enzima β -galactosidase com melhores propriedades cinéticas (maior afinidade com lactose, representada pelo parâmetro K_m e menor inibição pelo produto galactose, representada por K_i) estudaram a produção de enzima recombinante de *Kluyveromyces lactis* em *Escherichia coli* através de um biorreator. Encontraram seis novas β -galactosidases metagenomas (M1-M6). Os experimentos foram conduzidos com a espécie que se mostrou a melhor candidata através de testes em seu DNA. Além disso, visando a aplicação da enzima na indústria de alimentos, conduziram seus experimentos à baixa temperatura (8 °C), uma vez que o processamento do leite se dá na faixa 5-10 °C. Os resultados obtidos foram bastante satisfatórios. Após 25 horas de processamento, a lactose foi completamente hidrolisada (> 99,99%) pela enzima recombinante obtida, o que possibilitaria sua aplicação no processamento de produtos considerados “sem lactose”, uma vez que atende aos padrões de <100 mg de lactose por litro exigidos na fabricação de tais produtos.

3.5.2 β -Galactosidases de Fungos

Os fungos são seres que apresentam características heterotróficas, isto é, são desprovidos de clorofila, e por isso a necessidade de material orgânico para sua sobrevivência. Dessa forma, a nutrição desses seres é feita através da absorção de nutrientes, que se tornam assimiláveis devido à presença de enzimas que sintetizam.

A produção da enzima β -galactosidase por fungos, especialmente do gênero *Aspergillus*, é um dos processos de produção de lactases mais estudados. Uma das razões desse interesse na produção da enzima por via fúngica se deve à faixa de pH ótimo que apresentam, entre 2,5 e 6, o que torna essas enzimas bastante apropriadas para o processamento de soro de leite ácido, uma importante aplicação na indústria de laticínios e derivados. Além disso, a temperatura ótima para estas enzimas é alta, o que as tornam eficientes em processos com temperaturas superiores a 50°C.

Outra vantagem do ponto de vista da aplicação industrial se deve ao fato da maioria das enzimas produzidas por fungos serem extracelulares, o que facilita sua recuperação do

meio fermentado (BORZANI et al, 1975). Entretanto, algumas espécies apresentam produção intracelular, como por exemplo, a β -galactosidase obtida de *Aspergillus oryzae*. Nesse caso é preciso haver o rompimento celular ou tratamento por autólise celular para a extração da enzima. A autólise celular é um tratamento feito através da permeabilização da membrana celular sem provocar a desnaturação da enzima. Essa técnica utiliza agentes químicos aptos a desorganizar a membrana plasmática, como por exemplo, solventes orgânicos (etanol, tolueno, éter e clorofórmio), surfactantes, entre outros (FLORES et al., 1994).

Entre os fungos capazes de produzir lactases, destaca-se a espécie *Aspergillus niger*, que apresenta grande interesse comercial. Uma das razões pode ser explicada pela diversidade de reações sintetizadas pela espécie. Além disso, esse fungo tem a capacidade de produzir enzimas variadas.

3.5.2.1 Estudos Referentes à β -Galactosidases de Fungos

Santos (2006) estudou a produção de GOS a partir de extrato bruto da enzima β -galactosidase de *Scopulariopsis sp* cultivado em fermentação semi-sólida em meio contendo farelo de trigo e água na proporção 1:1. A enzima foi isolada após adição de etanol resfriado 70%. Essa solução foi mantida em repouso por 1h e posteriormente centrifugada para obtenção de precipitado de enzima bruta. A atividade enzimática foi iniciada após o quinto dia de fermentação, atingindo o seu máximo no 7º dia de crescimento, quando apresentou atividade de 0,55 μ mol de ONP/mg/min (ONP é definida como a quantidade de enzima capaz de catalisar a liberação de 1 μ mol de o-nitrofenol por minuto). O fungo foi capaz de sintetizar a enzima sem a necessidade de adição de lactose, demonstrando ser uma enzima constitutiva. Os experimentos mostraram que a máxima produção de GOS se deu em meio com concentração de lactose 40% após 12 horas de reação. Outro objetivo do trabalho de Santos (2006) foi a realização de um estudo comparativo entre a produção de GOS por *Scopulariopsis sp* e por *Aspergillus oryzae*. Os resultados obtidos mostraram que a enzima obtida de *Scopulariopsis sp* foi capaz de converter 20% da lactose em GOS, enquanto a enzima de *A. oryzae* converteu apenas 6% da lactose.

Barbosa e colaborador (2007) realizaram um projeto visando à produção de β -galactosidase utilizando soro de queijo (72% lactose, 11% de proteína total e 7% de sais minerais) como meio de cultura para o crescimento dos fungos filamentosos *Aspergillus niger*

NRRL 337. Os nutrientes utilizados foram extrato de levedura, peptona bacteriológica, fosfato monobásico de potássio, sulfato de amônio e caseína. Analisaram a interferência das variações das concentrações de lactose presente no soro de queijo e dos sais e extrato de levedura no crescimento celular (g/L) e, conseqüentemente, na produção da enzima. Amostras foram coletadas em intervalos de 24 horas ao longo de 120 horas de fermentação e testes de massa celular, açúcar redutor e atividade enzimática foram efetuados. Os ensaios foram realizados à temperatura de 37 °C. O máximo crescimento celular obtido foi de 16,1 g/L conduzido a 40,0 g/L de soro e 4,0 g/L dos nutrientes citados, com exceção do sulfato de amônio. A máxima atividade enzimática encontrada foi de 16,02 UGI/mL (unidade de glicose produzida por minuto, por mililitro de suspensão enzimática) após 96 horas de fermentação e concentrações de 20,0 g/L de soro e 4,0 g/L dos nutrientes.

Silva e colaboradores (2009) conduziram um trabalho com o intuito de avaliar a produção enzimática por *Aspergillus niger* em fermentação submersa no soro de leite. Utilizaram como meio de cultura uma solução de batata 10g/L com glicose 20g/L. Durante as fermentações, foram avaliados o consumo de lactose e carboximetilcelulose, a formação de biomassa e a produção das enzimas β -galactosidase e celulase, por um período de oito dias. Os resultados obtidos mostram que *A. niger* cresce em soro de leite apresentando um tempo de fase lag de 3,7 horas e velocidade específica decrescimento celular de $0,102 \text{ h}^{-1}$. A máxima atividade enzimática para celulase foi de 1113 U/L e de 2267 U/L para β -galactosidase durante para 46 h de fermentação (U representa a conversão de um μmol de lactose por minuto nas condições reacionais ótimas).

Fischer (2010) estudou a reação de hidrólise da lactose por β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* imobilizada por adsorção e ligação cruzada com glutaraldeído, utilizando como suporte resina de troca iônica. O substrato utilizado foi uma solução de lactose em tampão acetato pH 4,5, leite desnatado e soro de leite. A máxima atividade da enzima se deu à temperatura de 60°C, com concentração inicial de lactose de 50 g/L a pH 4,5. Nessas condições, a taxa média de reação foi de 2074 U e conversão de lactose de 65%. Com o intuito de aumentar a conversão da reação, repetiram-se os experimentos em dois reatores de leito fixo em série, operando em regime contínuo. Com essa nova configuração, aumentou-se a conversão da lactose em 26%. A enzima imobilizada manteve sua atividade durante 30 dias de operação em reator de leito fixo à temperatura ambiente.

Mortoza (2012) estudou a síntese de β -galactosidase obtida de *Aspergillus foetidus* em meio líquido com diferentes fontes de carbono a 28 °C sob agitação de 120 rpm.

Observou-se que a maior produção enzimática ocorreu com a adição de farelo de trigo ao substrato contendo lactose. Os resultados mostraram que a atividade específica para a enzima β -galactosidase foi maior em sete dias de fermentação resultando no valor de $1,4 \times 10^2$ UI/mg de proteína. A enzima produzida extracelularmente passou por processo de purificação micelar de duas fases aquosas. A melhor condição de purificação foi obtida com sistema formado por 8% (p/p) Triton X-114, 10% (p/p) de caldo fermentado e 28°C de temperatura de incubação. Nessas condições, 89,8% da atividade enzimática adicionada ao sistema foi recuperada na fase pobre em micelas que indicou pH ótimo para enzima purificada igual a 2,6 e temperatura ótima de 60°C.

Niu e colaboradores (2017) estudaram a produção de outros três tipos de β -galactosidase por *Aspergillus niger*. Além da já conhecida enzima com gene LacA, foram realizados estudos com o intuito de obtenção da atividade enzimática de enzimas com genes denominados LacB, LacC e LacE que foram clonadas, sequenciadas e segregadas com sucesso pela levedura *Pinchia pastoris*. Descobriram que essas três novas proteínas e LacA possuem seqüências de sinais N-terminais e, portanto, se tratam de enzimas extracelulares. Apresentam estrutura típica de β -galactosidasas fúngicas com atividades de hidrólise e transgalactosilação definidas em lactose. No entanto, suas propriedades de atividade diferiram. Em particular, LacB e LacE apresentaram atividade hidrolítica máxima a pH 4-5 e 50 °C, enquanto LacC exibiu atividade máxima a pH 3,5 e 60 °C. Todas as β -galactosidasas realizaram atividade de transgalactosilação otimamente em um ambiente ácido.

3.5.3 β -Galactosidasas de Bactérias

A enzima β -galactosidase pode ser produzida por um vasto número de bactérias, mas as do gênero *Streptococcus thermophilus* e *Bacillus thermophilus* são consideradas as fontes primordiais bacterianas desta enzima, juntamente com a lactase proveniente de *Escherichia coli*, que apresenta reduzida aplicação industrial devido ao fato de não ser considerada segura em alimentos, ou seja, a espécie microbiana não é classificada como GRAS (USTOK et al., 2010). Tal fato também justifica a considerável diminuição de estudos relacionados à produção de β -galactosidasas de origem bacteriana e o consequente aumento em pesquisas que visam à obtenção da enzima através de fungos e leveduras, conforme visto em 3.5.1 e 3.5.2.

Entretanto, enzimas obtidas de bactérias ácido lácticas (LAB) termofilicas são consideradas uma fonte interessante de obtenção enzimática, uma vez que são classificadas como GRAS. Dentre as bactérias ácido lácticas, as espécies *Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus* são as que apresentam maiores índices de produção de β -galactosidases (SHAH e JELEN, 1991). As β -galactosidases destas culturas apresentam elevada estabilidade e atividade em altas temperaturas, que além de aumentar taxa de hidrólise da lactose também previne o crescimento de microrganismos indesejáveis (SHAH e JELEN, 1991). Entretanto, a β -galactosidase da LAB termofilico é uma enzima intracelular, o que dificulta a recuperação enzimática que deverá ser realizada através de ruptura mecânica da membrana celular ou através da utilização de produtos químicos capazes de realizar essa ruptura (USTOK et al., 2010).

3.5.3.1 Estudos Referentes à β -Galactosidases de Bactérias

Em 1997, Magalhães estudou a fermentação alcoólica de soro de queijo por *Klebsiella oxytoca* M5A1. Em seu trabalho, observou que a temperatura ótima para produção da enzima β -galactosidase foi de 30 °C. O pH e a temperatura de máxima atividade enzimática foram 7,0 e 45 °C, respectivamente. A enzima não apresentou estabilidade em temperaturas superiores a 35 °C. Testes envolvendo a adição de glicose e galactose também foram realizados e foi possível observar que a adição de ambos os açúcares reduziram ligeiramente a produção da enzima. O tratamento das células também foi um parâmetro estudado por Magalhães (1997). Observou que células permeabilizadas com tolueno apresentaram 1,3 vezes mais atividade de β -galactosidase comparado a células não tratadas, o que indica baixa eficiência na entrada de substrato nas células.

Silva e colaboradores (2014) utilizaram soro de leite como substrato visando à produção de β -galactosidase por diversas bactérias ácido lácticas isoladas de queijo coalho, reativadas em suas respectivas temperaturas de isolamento. Em seguida, 10% (v/v) das culturas foram inoculadas em soro de leite bovino e incubadas nas mesmas condições da reativação. Posteriormente passaram por centrifugação e o sobrenadante foi congelado para posterior avaliação da produção enzimática. Os gêneros estudados foram *Enterococcus*, *Streptococcus* e *Lactobacillus*. Os resultados mostraram que foram obtidos quatro tipos de enzimas para cada tipo de microrganismo. Os autores classificaram as enzimas como: ácida

extracelular, ácida intracelular, neutra extracelular e neutra intracelular. A máxima atividade enzimática das amostras dos três microrganismos foi observada para β -galactosidase neutra extracelular, seguida por β -galactosidase neutra intracelular, β -galactosidase ácida extracelular e por fim β -galactosidase ácida intracelular. O microrganismo com maior produção enzimática foi *Streptococcus*.

Kamran e colaboradores (2015) estudaram a produção e isolamento de β -galactosidase obtida de cepas de *Bacillus B-2*. Observaram que a máxima produção enzimática ocorreu em substrato contendo 1% de lactose após 48h de fermentação sob agitação de 120 rpm. Nestas condições, a atividade enzimática observada foi de 25 U/mL. Também observaram que em substrato contendo 3% de lactose, a atividade enzimática era de apenas 15% do valor obtido em substrato 1%. Os autores justificaram que essa diminuição na produção de enzimas ocorre devido ao aumento da viscosidade do meio de crescimento capaz de gerar disponibilidade inadequada de oxigênio e nutrientes para células microbianas, acarretando em mínima multiplicação celular.

Geiger e colaboradores (2016) estudaram a hidrólise da lactose do soro de queijo através de β -galactosidase recombinante de *Streptococcus thermophilus* em *Lactobacillus plantarum* WCFS1, microrganismo considerado GRAS. Os cultivos em laboratório renderam 11000 U de atividade de β -galactosidase por litro de cultura correspondente a aproximadamente 170 mg de enzima. Além disso, a enzima apresentou alta atividade de transgalactosilação. Ao utilizarem uma concentração inicial de lactose no soro de leite de 205 g/L de lactose a 50 °C, obtiveram uma conversão de 90% da lactose, após 5 h de reação, dos quais 50% dos açúcares obtidos eram GOS.

Nos últimos anos, estudos estão sendo realizados com o intuito de obtenção de enzimas β -galactosidas que apresentem elevada atividade quando em meios a baixas temperaturas. Algumas espécies de bactérias tem se mostrado interessantes nesse propósito e vem sendo estudadas por diversos autores, conforme discussão abaixo.

Pawlak-Szukalska e colaboradores (2014) estudaram um gene capaz de codificar uma nova β -galactosidase de origem antártica, *Arthrobacter sp*, que foi isolado, clonado e inserido em *E. coli*. A forma ativa da β -galactosidase recombinante consiste em duas subunidades com peso molecular de aproximadamente 257 kDa. A atividade máxima da enzima para ONPG se deu a 28 °C e pH 8,0. Entretanto, apresentou 42% da atividade máxima à 10 °C e foi capaz de hidrolisar tanto a lactose quanto o ONPG nessas condições.

Observaram que a enzima foi capaz de hidrolisar 90% da lactose em 1 mL de leite a 10°C em 24 horas. Além disso, a nova enzima foi capaz de sintetizar GOS em uma faixa de temperatura entre 10-30 °C. As propriedades apresentadas pela β -galactosidase de *Arthrobacter sp* a tornam uma excelente opção para aplicação industrial, principalmente na etapa de esterilização do leite, além de uma ferramenta promissora para a glicosilação de compostos termossensíveis.

3.6 ESTUDO COMPARATIVO

Neste capítulo, o objetivo é realizar um estudo comparativo entre as propriedades apresentadas pela enzima β -galactosidase obtida de diferentes fontes microbiológicas: leveduras, fungos e bactérias.

Para efeito de comparação, alguns parâmetros serão discutidos baseados em discussões e análises feitas nas seções anteriores, como pH ótimo e pH de estabilidade, temperatura, produção de GOS, técnicas de recuperação enzimática.

3.6.1 pH Ótimo e pH de Estabilidade

De modo geral, β -galactosidases obtidas de leveduras apresentam pH ótimo de operação e pH de estabilidade com valores próximos ao neutro. Essa propriedade favorece a aplicação da enzima de leveduras em sistemas que não apresentam variação significativa na concentração de íons H^+ e OH^- e são mantidos na faixa de neutralidade de pH, como por exemplo processos de hidrólise do leite e soro de leite doce. No estudo de Falleiros (2016), essa propriedade foi comprovada durante experimentos realizados para produção de β -galactosidase de *K. marxianus*, que em substrato contendo 70g/L de lactose e pH 7,0, apresentou atividade específica máxima (35,535 U mg proteína⁻¹). Entretanto, outros estudos envolvendo a produção de β -galactosidase por leveduras, indicam que o pH que favorece a maior atividade enzimática se encontra na faixa ácida, como por exemplo, o trabalho desenvolvido por Al-jaizairi et al. (2015), que demonstrou que a máxima atividade enzimática de *K. marxianus* foi obtida a pH 3,0. Para explicar essa divergência de valores, não se pode apenas atribuir a faixa ótima de pH ao tipo de microrganismo produtor, mas também às outras

condições de operação para obtenção da enzima, como por exemplo, natureza do substrato, temperatura de operação, agitação, entre outros.

As enzimas obtidas via síntese por bactérias também apresentam pH ótimo e de estabilidade na faixa básica. Em contrapartida, as β -galactosidases produzidas a partir de fungos se mostram ativas quando em pH ácido e, portanto, utilizadas na maioria das vezes para hidrólises em ambientes ácidos.

3.6.2 Temperatura

Comparada com β -galactosidases sintetizadas por fungos e bactérias, as obtidas através de leveduras se apresentam mais termos sensíveis, uma vez que sua faixa de temperatura ótima está abaixo da faixa de temperatura relativamente alta dos fungos e bactérias (50 – 60 °C).

Atualmente, diversos estudos estão sendo realizados objetivando a obtenção de lactases com atividade enzimática satisfatória a baixas temperaturas. Erich et al. (2015) obtiveram resultados bastante satisfatórios em seus experimentos à 8 °C utilizando β -galactosidase recombinante de *K. lactis* em *E. coli*. Nessa situação, a enzima foi capaz de hidrolisar 99% da lactose presente no meio. Seguindo a mesma linha de pesquisa, Pawlak-Szukalska et al. (2014), estudaram uma nova enzima β -galactosidase recombinante de *Arthrobacter sp* em *E. coli* que apresentou, à 10 °C, 42% da atividade enzimática obtida à 28 °C. Além disso, também a baixas temperaturas, foi capaz de sintetizar galactooligossacarídeos.

3.6.3 Produção de Galactooligossacarídeos

Estudos mostram que a capacidade de sintetizar GOS não está relacionada apenas à origem da enzima, mas também às condições operacionais de temperatura, pH e concentração, uma vez que as reações de transgalactosilação e hidrólise são competitivas (FAI et al., 2015). Ou seja, quando em condições onde há excesso de água ou baixa concentração de lactose, a hidrólise é favorecida frente à transgalactosilação e, portanto, a síntese de GOS é baixa. A

literatura apresenta diversos trabalhos relacionados com a produção de GOS pela enzima β -galactosidase.

Onishi et al. (1996), pesquisaram a produção de GOS a partir da levedura *Sirobasidium magnum* CBS 6803 e verificaram que a produção de GOS aumentou com relação ao tempo. Os autores obtiveram 136 mg/mL de GOS formados depois de um período de incubação de 42 h. Uma quantidade considerável de glicose foi produzida, mas pouca galactose foi formada. Após a adição de tolueno tratado com glicose oxidase, para a retirada da glicose, que inibe a produção de GOS, verificou-se que a quantidade de GOS produzido foi de 224 mg/mL, ou seja, a produtividade de GOS aumentou consideravelmente, demonstrando que esta combinação foi bastante favorável.

Chockchaisawasdee et al. (2005) realizaram um estudo da síntese de GOS a partir de *Kluyveromyces lactis*, em relação à concentração de lactose e concentração da enzima. Os resultados mostraram que a quantidade de GOS formada dependeu da concentração da lactose, mas não da concentração da enzima.

3.6.4 Técnicas de Recuperação Enzimática

O processo de separação e recuperação enzimática depende inicialmente do tipo de enzima de interesse: intracelular ou extracelular. Não há uma regra quanto ao tipo de enzima produzida por cada espécie de microrganismo. Assim sendo, uma mesma espécie de levedura, por exemplo, é capaz de sintetizar, simultaneamente, enzimas intra e/ou extracelulares.

Segundo Costa (2013), no caso das enzimas extracelulares, o processo de recuperação tem início no líquido fermentado ou no caso de fermentações em meio sólido, no líquido de extração do substrato. No caso das enzimas intracelulares é necessária a aplicação de algum método prévio de ruptura celular a fim de liberar as enzimas. Porém, em todas as etapas de separação e recuperação das enzimas, independente de sua natureza, é necessária a manutenção das condições não desnaturantes, isto é, condições sob as quais as enzimas perdem atividade. No caso de enzimas produzidas extracelularmente, em geral, o material fermentado (ou o extrato de fermentações em meio sólido) segue as seguintes etapas de tratamento:

- 1) Separação sólido-líquido para remoção das células do microrganismo envolvido;

- 2) Refrigeração até cerca de 5°C com o intuito de preservar a atividade enzimática;
- 3) Concentração da solução, através de técnicas como por exemplo, evaporação a vácuo ou ultrafiltração;
- 4) Etapas de purificação com intuito de obtenção de produtos com elevado grau de pureza;
- 5) Secagem em condições não desnaturantes nos casos de produtos comercializados como pó.

No caso das enzimas de interesse serem intracelulares, há demanda por operações unitárias adicionais.

CAPÍTULO 4

CONCLUSÕES

O presente trabalho conseguiu abranger todos os objetivos propostos. Através de uma revisão bibliográfica foi possível apresentar e discutir conceitos relacionados à produção da enzima β -galactosidase.

Propriedades físico-químicas da lactose foram apresentadas, bem como características e conceitos relacionados à reação de hidrólise desse composto. Os produtos da reação são os monômeros glicose e galactose que apresentam como característica principal melhores propriedades organolépticas quando comparados ao seu composto de origem, a lactose. Tais propriedades se mostram vantajosas na aplicação industrial dessa reação catalisada pela enzima β -galactosidase. Além de sua aplicação industrial, principalmente no setor de alimentos, a enzima lactase também apresenta relevante papel na indústria farmacêutica em tratamento de doenças e sintomas relacionados à intolerância à lactose, bem como na síntese de compostos prebióticos como galactooligossacarídeos obtidos a partir de reação catalisada pela enzima em estudo.

Diante disso, realizou-se uma análise de diversos trabalhos publicados por autores em todo o mundo que através de experimentos e aplicações de técnicas foram capazes de estudar as diversas fontes de obtenção da enzima β -galactosidase, com ênfase em fontes microbiológicas que apresentam maior capacidade de síntese e extração enzimática. Por esses trabalhos, diversos conceitos também foram explorados, com o intuito de enriquecer a análise e realizar um estudo comparativo das distintas fontes de obtenção. Os estudos mostraram diferentes técnicas relacionadas a métodos de recuperação e reutilização enzimática, bem como a escolha de parâmetros operacionais, como temperatura e pH, capazes de otimizar a produção.

Com isso, os objetivos gerais e específicos para este trabalho foram amplamente discutidos e analisados.

CAPÍTULO 5

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AIT-AISSA, A.; AIDER, M. **Lactulose: production and use in functional food, medical and pharmaceutical applications.** Practical and critical review. International Journal of Food Science and Technology 49: 1245-1253, 2014.
- ALEJANDRA, O.; Ramírez, M.; NILO RIVAS, R. **Producción y caracterización parcial de β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* propagada em suero de leche desproteínizado.** Archivos Latinoamericanos de Nutrición, v. 53, n.2, p.194-201, 2003.
- ALENCAR, A. A. **Produção de bacitracina por *Bacillus licheniformis* (UCP1010) utilizando meio alternativo à base de soro de leite.** Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais) - Universidade Católica de Pernambuco, 2011.
- AL-JAZAIRI, M., ABOU-GHORRA, S., BAKRI, Y., MUSTAFA, M. **Optimization of β -galactosidase production by response surface methodology using locally isolated *Kluyveromyces marxianus*.** Int. Food. Res. J. 22 (4), 1361-1367, 2015.
- AMMAM, M.; FRANSAER, J. **Two-enzyme lactose biosensor based on β -galactosidase and glucose oxidase deposited by AC-electrophoresis: characteristics and performance for lactose determination in milk.** Sensors and actuators B: Chemical, 148: 583 – 589, 2010.
- BARBOSA, M. R.; ARAUJO, E. H.. Estudo da produção da enzima lactase utilizando soro de queijo e fungo filamentoso *Aspergillus niger*. In: VI ENCONTRO INTERNO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, Uberlândia, 2007.
- BASSETTI, F. J. **Caracterização da Invertase Imobilizada em Sílica de Porosidade Controlada e sua Aplicação em Reator de Leito Fixo e Fluidizado.** Dissertação (Mestrado) - Departamento de Tecnologia e Alimentos e Medicamentos, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 1995.
- BLANK, L. M.; LEHMBECK, F.; SAUER, U. **Metabolic-flux and network analysis on fourteen hemiascomycetous yeasts.** Federation of European Microbiological Societies Yeast Research, 5: 545 – 558, 2004.

BORZANI, W.; LIMA, U. DE A. E AQUARONI, E., 1975, “Engenharia Bioquímica”, Edgard Blucher Ltda, Brasil, Vol. 3.

BRANDÃO, S.C.C. Soro: Um desafio para as fábricas de queijo. **Leite e Derivados**, n. 15, p. 13-19, 1994.

CARMINATTI, C. A. **Ensaio de hidrólise enzimática da lactose em reator a membrana utilizando β -galactosidase *Kluyveromyces lactis***. 2001. 66f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Departamento de Engenharia Química – UFSC, 2001.

CAVAILLE, D.; COMBES, D. **Characterization of β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis***. *Biotechnology Appl. Biochemistry*, v.22, p.55-64, 1995.

CHEN, C. S.; HSU, C. K.; CHIANG, B. H. Optimization of the enzymic process for manufacturing low-lactose milk containing oligosaccharides. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 801-808, 2002.

CHOCKCHAIWASDEE, S.; ATHANASOPOULOS, V. I.; NIRANJAN, K.; RASTALL, R. A. Synthesis of galacto-oligosaccharide from lactose using β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*: studies on batch and continuous UF membrane-fitted bioreactors. **Biotechnology and Bioengineering**, Hoboken, v. 89, n. 4, p. 434-443, 2005.

COSTA, H.F.T.; MASARIN, F.; BONIFÁCIO, T.; MILAGRES, A.M.F.; FERRAZ, A. **The enzymatic recalcitrance of internodes of sugar cane hybrids with contrasting lignin contents**. *Industrial Crops and Products*, v. 51, p. 202-211, 2013.

DEVLIN, T. M. **Manual de bioquímica com correlações clínicas**. 6. ed. São Paulo: Edgard Blücher, 2008.

DINIZ, R. H. S. **Metabolismo de lactose em *Kluyveromyces marxianus* UFV3 e *Kluyveromyces lactis* JA6**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, 2009.

ERICH, S.; KUSCHEL, B.; SCHWARZ, T.; EWERT, J.; BOHMER, N.; NIEHAUS, F.; ECK, J.; LUTZ-WAHL, S.; STRESSLER, T.; FISCHER, L. **Novel high-performance matagenome β -galactosidase for lactose hydrolysis in the dairy industry**. *Journal of Biotechnology* 210: 27-37, 2015.

FAI, A. E. C., PASTORE, G. M. **Galactooligossacarídeos: produção, benefícios à saúde, aplicação em alimentos e perspectivas**. Scientia Agropecuaria 6 (1): 69 – 81, 2015.

FALLEIROS, L. N. S. S. Produção e caracterização de β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* ATCC 46537. Tese (Doutorado) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, 2016.

FENNEMA, S. D. K. L. P. O. R. **Química de Alimentos Fennema**. Artmed Editora, 2009.

FISCHER, J. **Hidrólise de lactose por β -galactosidase de *Aspergillusoryzae* imobilizada em reator de leito fixo**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, Minas Gerais, 136 p., 2010.

FLORES, M.V.; VOGET, C.E.; ERTOLA, R.J.J. Permeabilization of yeasts cells (*Kluyveromyces lactis*) with organic solvents. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 16, n. 4, p. 340-346, 1994.

FOGLER, H.S. **Elements of Chemical Reaction Engineering**. 2 ed. New Jersey: Prentice Hall, 838 p. 1992.

FONSECA, G.G., HEINZLE, E., WITTMANN, C., GOMBERT, A.K. The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 79, p. 339-354, 2008.

FOWLER, A.; ZABIN, I. Amino acid sequence of β -galactosidase. J Biological Chem, 1978.

FREITAS, F. F. **Otimização do Processo de Imobilização de β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* em Alginato de sódio com gelatina e glutaraldeído**. Tese (Doutorado) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2007.

FREITAS, F. F.; RIBEIRO, E. J.; MARQUEZ, L. D.; CARDOSO, V. L.; BRANDÃO, G. C; RIBEIRO, G. P. A comparison of the kinetic properties of free and immobilized *Aspergillus oryzae*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 58-59, p. 33-38, 2011.

FURLAN, S. A.; SCHNEIDER, A. L. dos S.; MERKLE, R.; CARVALHO-JONAS, M. de F. JONAS, R. **Formulation of a lactase-free, low-cost culture medium for the production of β -galactosidase by *Kluyveromyces marxianus***. Biotechnology letters, 22: 589 – 593, 1995.

GANZLE, M. G.; HAASE, G.; JELEN, P. Lactose: crystallization, hydrolysis and value-added derivatives. *Int Dairy J*, 2008.

GEIGER, B.; NGUYEN, H. M.; STEFANIE WENIG, S.; NGUYEN, H. A.; LORENZ, C.; KITTL, R.; MATHIESEN, G.; EIJSSINK, V. G.H.; HALTRICHA, D.; NGUYEN, T. **From by-product to valuable components: Efficient enzymatic conversion of lactose in whey using β -galactosidase from *Streptococcus thermophilus***. *Biochemical Engineering Journal* 116: 45–53, 2016.

GÉKAS, V.; LOPEZ-LEIVA, M. Hydrolysis of lactose: A Literature Review. **Process Biochemistry**, v. 20, pp. 2-12, 1985.

GODOY, A. S. **Estudos estruturais e funcionais das enzimas β -galactosidase de bactérias**. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016.

GUIDINI, C. Z.; FISCHER, J.; RESENDE, M. M.; CARDOSO, V. L.; RIBEIRO, E. J. β -Galactosidase of *Aspergillus oryzae* immobilized in an ion exchange resin combining the ionic binding and crosslinking methods: Kinetics and stability during the hydrolysis of lactose. **Journal Of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, v.71, p. 139–145, 2011.

HATZINIKOLAOU, D. G.; KATSIFAS, E.; MAMMA, D.; KARAGOUNI, A.; CHRISTAKOPOULOS, P.; KEKOS, D. **Modeling of the simultaneous hydrolysis-ultrafiltration of whey permeate by a thermostable β -galactosidase from *Aspergillus niger***. *Process Biochemistry*, v. 24, p. 161-172, 2005.

HENG, M. H.; GLATZ, C. E. Ion exchange immobilization of charged β -galactosidase fusions for lactose hydrolysis. **Biotechnology Bioeng.**, v. 44, n. 6, p. 745-752, 1994.

HOBMAN, P.G. Review of process and products for utilization of lactose in deproteinized milk serum. **Journal of Dairy Science**, v. 67, n.11, p. 2630-2653, 1984.

JUERS, D.H.; JACONSON, R.H.; WIGLEY, D.; ZHANG, X. J.; HUBER, R.E.; TRONRUD, D.E. **High resolution refinement of β -galactosidase in a new crystal form reveals multiple metal-binding sites and provides a structural basis for α -complementation**. *Protein Sci*, 2000.

JURADO, E; CAMACHO, F.; LÚZON, G.; VICARIA, J. M. A new kinetic model proposed for enzymatic hydrolysis of lactose by a β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, n° 3, p. 300 – 309, 2002.

KAMRAN, A.; Bibi, Z.; AMAN, A.; QADER, S. A. U. **Lactose hydrolysis approach: Isolation and production of β -galactosidase from newly isolated *Bacillus* strain B-2.** Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 2015.

KIELING, D. D. **Enzimas, aspectos gerais.** Centro Tecnológico Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Engenharia Química e de Alimentos, Florianópolis, 2002.

KIRK, O.; BORCHERT, T. V.; FUGLSANG, C. C. **Industrial enzyme applications.** Current opinion in biotechnology, 13: 345 – 351, 2002.

KLEIN, M. P. **Imobilização de β -galactosidase para obtenção de produtos lácteos com baixo teor de lactose.** Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2010.

KRAJEWSKA, B. **Application of chitin and chitosan based materials for enzyme immobilizations: a review.** Enzyme and Microbial Technology, v.35, p. 126-139. 2004.

LADERO, M.; SANTOS, A.; GARCIA-OCHOA, F. Kinetic modeling of lactose hydrolysis with an immobilized β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, n. 8, p. 583-592, 2000.

LANE, M. M.; MORRISEY, J. P. *Kluyveromyces marxianus*: a yeast emerging from its sister's shadow. Fungal Biology Reviews, 24: 17 – 26, 2010.

LIMA, A. F. **Imobilização de uma β -galactosidase produzida por *Kluyveromyces lactis* NRRL Y-1564 cultivada em soro de leite.** Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2012.

LISBOA, C. R. **Síntese enzimática de galacto-oligossacarídeos a partir de lactose e soro de leite.** Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Rio Grande / RS, 2009.

LÓPEZ-LEIVA, M. H.; GUZMAN, M. Formation of oligosaccharides during enzymic hydrolysis of milk whey permeates. **Process Biochemistry**, v. 30, p. 757-762, 1995.

- MAGALHÃES, C. H. **Fermentação alcoólica de soro de queijo por *Klebsiella oxytoca* M5A1, recombinante P2**. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1997.
- MARIOTTI, M.P. **Hidrólise da lactose de soro de leite por meio de β -galactosidase imobilizada**. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 2000.
- MARQUEZ, L. D. S.; SOUSA, G. D. B.; ASSIS, A. J.; RIBEIRO, E. J. **Synthesis of β -galactosidase in aerobic fermentation by *Kluyveromyces marxianus***. In: MERCOSUR CONGRESS ON CHEMICAL ENGINEERING, 2005.
- MARTINS, A; R, BURKERT, C.A.V. Revisão galactooligossacarídeos (GOS) e seus efeitos prebióticos e bifidogênicos. **Brazilian Journal of Food Technology** 12(3): 230-240, 2009.
- MATTAR, R.; MAZO, D. F. de C. **Intolerância à lactose: mudança de paradigmas com a biologia molecular**. Revista Associação Médica Brasileira, v. 56, n° 2: 230 –236, 2010.
- MATTHEWS, B. W. **The structure of E.coli β -galactosidase**. C R, Biol, 2005.
- MENDES, A.A.; OLIVEIRA, P.C.; CASTRO, H.F.; GIORDANO, R.L.C. **Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial**. Química Nova. 2011.
- MICHELON, M.; MANERA, A.P.; CARVALHO, A.L.; FILHO, F.M. **Concentration and purification of galactooligosaccharides using nanofiltration membranes**. International Journal of Food Science and Technology 49: 1953-1961, 2014.
- MORIWAKI, C.; MATIOLI, G. **Influence of β -galactosidase in milk technology and lactose maldigestion**. Arq Ciência Saúde. UNIPAR, 2010.
- MORTOZA, A. R. **Produção e purificação de β -galactosidase expressa por fungo isolado do bioma cerrado brasileiro visando à aplicação como suplemento digestivo**. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2012.
- NIU, D., TIAN, X., MCHUNU, N.P., JIA, C., SINGH, S., LIU, X., PRIOR, B.A., LU, F. **Biochemical characterization of three *Aspergillus niger* β -galactosidases**. Electronic Journal of Biotechnology, Vol. 27, Issue undefined, 2017.

OLIVEIRA, C. C. de. **Produção de β -galactosidase por levedura recombinante – desenvolvimento de um sistema de produção estável.** Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade do Minho, Portugal, 2005.

ONISHI, N.; KIRA, I.; YOKOZEKI, K. **Galacto-oligosaccharide production from lactose by *Sirobasidium Magnum CBS6803*.** Letters in Applied Microbiology. p. 253-256, 1996.

PAWLAK-SZUKALSKA, A.; WANARSKA, M.; POPINIGIS, A. T.; KUR, J. **A novel cold-active β -galactosidase with transglycosylation activity from the Antarctic *Arthrobacter sp.* 32cB – Gene cloning, purification and characterization.** Process Biochemistry 49: 2122–2133, 2014.

PEREIRA FILHO, D.; FURLAN, S. A. Prevalência de intolerância à lactose em função da faixa etária e do sexo: experiência do Laboratório Dona Francisca, Joinville (SC). **Revista Saúde e Ambiente.** Joinville, v. 5, n. 1, p. 24-30, 2004.

PEREIRA-RODRÍGUEZ, A.; FERNÁNDEZ-LEIRO, R.; GONZÁLEZ-SISO, M.I.; CERDÁN, M.E.; BECERRA, M.; SANZ-APARICIO, J. Structural basis of specificity in tetrameric *Kluyveromyces lactis* β -galactosidase. **Journal of Structural Biology**, v. 177, p. 392-401, 2012.

PRENOSIL, J.E.; STUKER, E.; BOURNE, J.R. **Formation of Oligosaccharides During Enzymatic Lactose.** Part I. State of Art. Biotechnology and Bioengineering. V.30, n.9, p. 1019-1025. 1987.

RAJOKA, M. I.; KHAN, S.; SHAHID, R. Kinetics and regulation studies of the production of β -galactosidase from *Kluyveromyces marxianus* grown on different substrates. **Food Biotechnology and Technology**, v. 41, n° 4: 315 – 320, 2003.

RECH, R. **Aproveitamento do soro de queijo para a produção de lactase por *Kluyveromyces marxianus*.** Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1999.

REGULY, J. C. **Biotecnologia dos processos fermentativos.** 1 ed. v. 3. Pelotas:UFPEL. 218p. 2000.

RUBIO-TEXEIRA, M. Endless versatility in the biotechnological applications of *Kluyveromyces* LAC genes. **Biotechnology Advances**, v. 24, p. 212-225, 2006.

SAKO, T.; MATSUMOTO, K.; TANAKA, R. Recent progress on research and applications of non-digestible galacto-oligosaccharides. **International Dairy Journal**, v. 9, p. 69-80, 1999.

SANTIAGO, P.A., MARQUEZ, L.D.S., CARDOSO, V.L., RIBEIRO, E.J. Estudo da Produção de β -Galactosidase por Fermentação de Soro de Queijo com *Kluyveromyces marxianus*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos** (Campinas - Brazil) 24, 567-572, 2004.

SANTOS, A. M. P. **Síntese de oligossacarídeo a partir de sacarose por inulinase de *kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus***. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, 161 p., 2002.

SANTOS, R. **Produção de galactooligossacarídeo por lactase fúngica**. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, 54p., 2006.

SCHNEIDER, A. L.S.; MERKLE, R.; BERTOLI, G. B.; JONAS, R.; FURLAN, S. A. **Estudos da produção de β -galactosidade por *Kluyveromyces marxianus* CDB 002 a partir de melaço de cana de açúcar**. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE FERMENTAÇÃO, São Carlos, 1996.

SCHOLZ, E.B. **Estudo cinético de *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 a partir de fontes alternativas de carbono e nitrogênio visando a síntese de β -galactosidase**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos) - Universidade da Região de Joinville – UNIVILLE, 89p., 2011.

SELVARAJAN, E.; MOHANASRINIVASAN, V. **Kinetic studies on exploring lactose hydrolysis potential of β -galactosidase extracted from *Lactobacillus plantarum* HF571129**. J Food Sci Technol. 52(10):6206-17., 2015.

SHAH, N. P.; FEDORAK, R.N.; JELEN, P. J. Food consistency effects of quarg in lactose malabsorption. **International Dairy Journal**, n. 2, p. 257-269, 1991.

SILVA, A.P.R. **Purificação de β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* utilizando sistema aquoso bifásico e separação por membranas**. Dissertação (Mestrado) - Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2009.

SILVA, E. C.; SANTOS, P. D.; FERNANDES, G. A.; MOTA, A. M. O.; PORTO, A. L. F.; CAVALCANTI, M. T. H. **Produção de β -galactosidase por bactérias ácido lácticas**

utilizando soro de leite. In: XX CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA, Florianópolis, 2014.

SILVA, N. K. G.; BARBOSA, R. C.; FILHO, U. C.; CARDOSO, V. L. Crescimento celular e produção de beta-galactosidase e celulase por *Aspergillus niger* em soro de leite. IN: VIII CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA EM INICIAÇÃO CIENTÍFICA, Uberlândia, 2009.

SILVEIRA, W. B. da. **Produção de etanol em permeado de soro de queijo por *Kluyveromyces marxianus* UFV-3.** Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa / MG, 2005.

SUAREZ, F.L.; SAVAIANO, D.A. **Diet, genetics and lactose intolerance.** Food Technology, 1987.

USTOK, F.I; TARI, C; HARSA, S. **Biochemical and thermal properties of β -galactosidase enzymes produced by artisanal yogurt cultures.** *Food chem.*, v.119, p.1114-1120, 2010.

VIEIRA, D. C. **Imobilização da enzima β -galactosidase de *Kuyveromyces fragilis* em agarose e quitosana utilizando diferentes protocolos de ativação.** Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de São Carlos, 2009.

WAITES, M. J.; MORGAN, N.L.; ROCKEY, J.S.; HIGTON, G. **Industrial Microbiology: na introduction.** 304 p. 2001.

YANG, S.T. e SILVA, E.M. Novel Products and New Technologies for Use of a Familiar Carbohydrate, Milk Lactose. **Journal of Dairy Science**, v. 78, n. 11, p. 2541 – 2562, 1995.

YANG, S.; OKOS, M.R. **Effects of Temperature on Lactose Hydrolysis by Immobilized Beta-Galactosidase in Plug-Flow Reactor.** *Biotechnoly and Bioengineering*, v.33, n.7, p.873-885. 1989.

ZADOW, J.G. Lactose – Properties and Uses. **Journal of Dairy Science**, v.67, n.11, p.2654-2679. 1984.

