



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA – UFU**



RAQUEL DE OLIVEIRA SILVA

**ANÁLISE COMPARATIVA DE SUPORTES E ESTRATÉGIAS PARA A
IMOBILIZAÇÃO DE β -GALACTOSIDASE VISANDO APLICAÇÃO INDUSTRIAL**

**Uberlândia
2019**

RAQUEL DE OLIVEIRA SILVA

análise comparativa de suportes e estratégias para a imobilização de β -galactosidase visando aplicação industrial

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Engenharia
Química, como parte dos requisitos
necessários à obtenção do título de
Bacharel em Engenharia Química.

Uberlândia, 26 de junho de 2019.

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a Larissa Nayhara Soares Santana Falleiros
(Orientadora)

Prof.^a. Dr.^a Juliana de Souza Ferreira
(FEQUI/UFU)

M. Sc. Carla Cristina Sousa
(Doutoranda PPGEQ/UFU)

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo o dom da vida, pelas incontáveis bênçãos e sustento para chegar até aqui. Louvores e glórias a ti, Senhor;

Aos meus pais Geraldo e Maura, pelo exemplo de vida, pelo amor, pelo apoio e esforços desmedidos para que eu alcançasse meus objetivos e sonhos;

Ao meu irmão Sérgio, por ser meu alicerce durante toda minha caminhada e sempre andar de mãos dadas comigo;

À minha irmã Débora, pela amizade e amor incondicional de irmãs, pelo acalento em momentos difíceis e os preciosos conselhos ao longo da vida;

Às minhas sobrinhas, Elisa e Amanda, por serem raios de luz e amor em nossas vidas;

Aos meus tios Helena e Nico, por todo incentivo e apoio em diversos momentos;

À todos os familiares, que torceram por meu sucesso;

Aos amigos Adrielle e Cassiano, que dividiram amizade, conhecimento, companheirismo e momentos inesquecíveis ao longo desta jornada;

À minha amiga Alessandra, que apesar da distância, sempre se fez presente nos bons e maus momentos;

À minha orientadora, professora Larissa, por toda instrução, apoio, ensinamentos e compreensão, imprescindíveis para a realização deste trabalho;

Enfim, agradeço a todos que contribuíram para que eu atingisse essa meta!

RESUMO

O uso de enzimas como biocatalisadores em processos industriais potencializa o rendimento de produto. Contudo, enzimas solúveis são caras e não podem ser reaproveitadas posteriormente, com isso uma alternativa altamente indicada é a técnica de imobilização, que torna a enzima estável, com alto grau de especificidade e apta a vários ciclos de uso sem comprometer o produto desejado. São possíveis diversas maneiras para a prática deste método: imobilização por retenção física, ligação à suporte e ligação cruzada, de modo geral. Entretanto, o desempenho da imobilização está muito condicionado à escolha do suporte adequado. Neste contexto, o intuito deste Trabalho de Conclusão de Curso foi contribuir para o estado da arte ao que se refere ao levantamento bibliográfico de suportes aplicados à imobilização da enzima β -galactosidase. Essa enzima tem grande destaque em uso industrial, em diversas áreas, sobretudo no mercado de intolerância à lactose. Para isto, foi feita investigação de pesquisas recentes e de destaque na literatura, com aplicação de diferentes materiais e combinações de técnicas para o conjunto suporte-enzima. Os trabalhos estudados foram analisados e comparados entre si, considerando aspectos como origem da enzima, preparação e tratamento do suporte, características dos derivados, método de imobilização, aplicação do suporte, rendimento, estabilidade. Concluiu-se que, devido à não existência de uma maneira única aplicável a todas as enzimas, as possibilidades são infinitas de combinações de imobilização-suporte e que, a depender do benefício esperado, a seleção dos suportes deve ser feita. Portanto, pesquisas e levantamentos nessa área de estudo são promissores e necessários.

Palavras-chave: Imobilização Enzimática; Suportes; β -Galactosidase.

ABSTRACT

The use of enzymes as biocatalysts in industrial processes boosts product yield. However, soluble enzymes are expensive and cannot be reused, so a highly indicated alternative is the enzymatic immobilization technique, which makes the enzyme stable, with a high degree of specificity and suitable for several cycles of use without compromising the desired product. There are several ways to practice this method: physical restraint immobilization, support attachment, and crosslinking in general. However, the immobilization performance is very dependent on the choice of the appropriate support. In this context, the purpose of this Course Completion Work was the contribution to the state of the art regarding the lifting of substrates applied to the immobilization of the β -galactosidase. This enzyme has great prominence in industrial use in several areas, especially in the lactose intolerance market. For this, research was carried out on recent and prominent research in the literature, with application of different materials and combinations of techniques for the support-enzyme set. The studied works were analyzed and compared to each other, considering aspects such as source of the enzyme, preparation and treatment of the support, characteristics of the derivatives, method of immobilization, application of the support, yield, stability. It was concluded that due to the non-existence of a unique way applicable to all enzymes, the possibilities of immobilization-support combinations are endless and that, depending on the expected benefit, the selection of the supports must be made. Therefore, research and surveys in this area of study are promising and necessary.

Key-words: Enzymatic Immobilization; Supports; β - Galactosidase.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1: Áreas de aplicação da β -galactosidase	9
Figura 2: Vista inferior do tetrâmero β -galactosidase <i>E. coli</i>	11
Figura 3: Métodos para imobilização de enzimas.	13
 Tabela 1: Classificação de suportes de acordo com sua origem.	 17

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	7
2.	OBJETIVOS	10
3.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	10
3.1.	β -galactosidase	10
3.2.	Imobilização.....	12
3.2.1.	Imobilização por Adsorção Física.....	13
3.2.2.	Imobilização por Ligação Iônica	14
3.2.3.	Imobilização por Ligação Covalente.....	14
3.2.4.	Imobilização por Encapsulamento.....	15
3.2.5.	Imobilização por Ligação Cruzada	16
3.2.6.	Materiais utilizados como suportes para imobilização.....	16
4.	SUORTES UTILIZADOS EM IMOBILIZAÇÃO DE β -GALACTOSIDASE.....	18
4.1.	Imobilização da β -galactosidase em nanopartículas magnéticas recobertas com quitosana e sua aplicação na síntese de galacto-oligossacarídeos à base de lactulose	18
4.2.	Sondando o confinamento de β -galactosidase em sílica mesoporosa por espectroscopia Raman.....	18
4.3.	Quelação por colágeno na imobilização de β -galactosidase de <i>Aspergillus oryzae</i> : um biocatalisador potencial para hidrolisar a lactose por processos descontínuos	19
4.4.	Preparação, caracterização e liberação <i>in vitro</i> de nano partículas de polieletrólito carregadas com β -galactosidase	20
4.5.	Estudo da imobilização de β -galactosidase de <i>Aspergillus oryzae</i> , <i>Kluyveromyces lactis</i> e <i>Saccharomyces marxianus</i> var <i>lactis</i> em matriz de alginato de cálcio, gelatina e transglutaminase	20
4.6.	Melhoria da atividade recuperada e estabilidade da β -galactosidase <i>Aspergillus oryzae</i> imobilizada em Duolite A568 por combinação de métodos de imobilização.....	21

4.7. Imobilização de β -galactosidase de <i>Aspergillus oryzae</i> em matriz de agarose funcionalizada por quatro diferentes métodos e aplicação na síntese de lactulose ..	22
4.8. Adsorção simultânea e fixação de β -galactosidase de <i>Aspergillus oryzae</i> na membrana de fibra oca polissulfona em camadas de polieletrólito	23
4.9. Síntese de galacto-oligossacarídeos prebióticos de lactose usando β -galactosidase bifidobacteriana (BbgIV) imobilizada em DEAE-Celulose, Q-Sepharose e amino-etil-agarose	23
4.10. Melhoria da derivatização de quitosana para a imobilização da β -galactosidase de <i>Bacillus circulans</i> e sua posterior aplicação na síntese de galacto-oligossacarídeos	24
4.11. Microencapsulação de β -galactosidase com diferentes biopolímeros por um processo de secagem por pulverização	24
4.12. Otimização do processo de imobilização da β -galactosidase por reticulação combinada de armadilhas e pela cinética da hidrólise da lactose	25
5. DISCUSSÃO	26
6. CONCLUSÃO	28
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30

1. INTRODUÇÃO

Os processos biotecnológicos são amplamente utilizados para gerar produtos com alto valor agregado em setores tão diversos como o de químicos, papel e celulose, mineração, têxteis e energia. Nos últimos 30 anos, a biotecnologia tem se transformado numa importante ferramenta para o aumento da capacidade inovadora de diversos setores da economia, especialmente nos países mais desenvolvidos e um grande destaque nesse campo é o uso de enzimas, que catalisam reações químicas. Diante desse fato, a pesquisa de novas enzimas ou o melhoramento do desempenho de catálise de enzimas já conhecidas se faz necessário.

Cortez (2017) afirma que diferente dos catalisadores metálicos nos processos químicos, as enzimas agem como um reagente ambientalmente favorável, uma vez que são completamente degradáveis e os processos enzimáticos são realizados sob condições operacionais mais brandas. Segundo o estudo realizado pela empresa de pesquisa *Freedonia Group*, a venda de enzimas poderia chegar a 2,8 bilhões de dólares em 2014 (SANTOS, 2012).

Entretanto, o alto custo com enzimas apresenta-se como um grande desafio para tornar sua aplicação viável. Diversas estratégias têm sido propostas para superar essa limitação desde o redesenho da molécula de enzima por técnicas de engenharia de proteínas até o desenho racional de matrizes e procedimentos para imobilização enzimática (FERNÁNDEZ-LAFUENTE et al., 1995; ILLANES, 1999; LÓPEZ GALLEGO et al., 2005; MATEO et al., 2007). A alternativa mais aplicada é a imobilização.

Uma enzima é definida como imobilizada quando ela está fisicamente ligada ou retida em um suporte sólido sobre o qual passa um substrato que é convertido em produto (CHIBATA, 1978; GUISÁN, 2006). Na década de 50 esta tecnologia foi apresentada, pela primeira vez, via produção de preparações enzimáticas imobilizadas por inclusão em matrizes poliméricas e por ligação em suportes. Desde então, foram desenvolvidos numerosos métodos de imobilização em diferentes materiais e, devido as suas vantagens sobre enzimas livres, seus derivados imobilizados são objetos de considerável interesse.

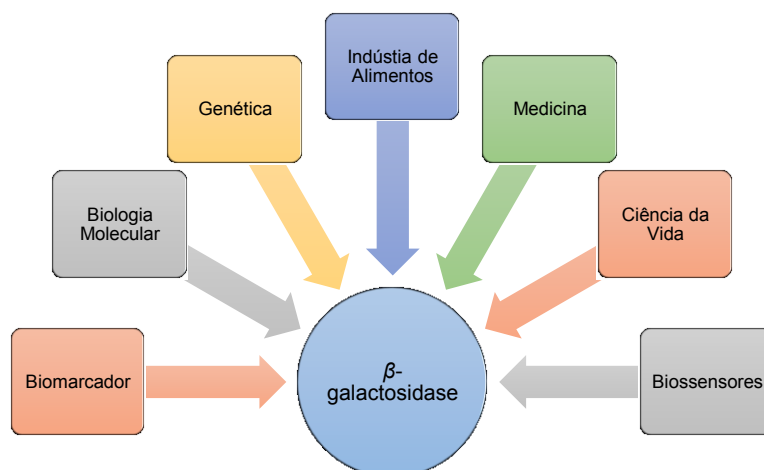
O uso de enzimas imobilizadas permite a implementação de sistemas de produção contínua com expressivos ganhos de produtividade. Além disso, como as enzimas estão sujeitas à inativação devido a fatores físicos, químicos ou biológicos

durante o armazenamento ou uso, enzimas imobilizadas tendem a ser mais estáveis podendo ser usadas em processos contínuos (GARCIA-GALAN et al., 2011). Portanto, a imobilização pode ser a chave para a otimização do desempenho operacional de uma enzima em processos industriais abrindo rotas alternativas para novas aplicações biotecnológicas. Dentre as muitas aplicações de imobilização enzimática, destaca-se a imobilização da enzima β -galactosidase, devido ao seu uso ser bem-sucedido na medida em que pode superar os problemas associados com os custos de enzimas solúveis.

β -galactosidase é uma enzima da família das hidrolases que catalisa a hidrólise da ligação glicosídica da lactose em glicose e galactose (ADAM et al., 2004) permitindo a redução do teor de lactose, o que implica em vantagens nutricionais e tecnológicas, e aumenta a doçura dos produtos lácteos. Segundo Mattar e Mazo (2010), no Brasil a intolerância à lactose acomete 80% dos indivíduos, 57% da população de cor branca, e chega a atingir 100% da população de origem japonesa. Ademais, essa intolerância afeta cerca de 70% da população adulta mundial, enquanto a taxa de prevalência de intolerância à lactose é de 60% no Paquistão. A intolerância a esse açúcar é devido à diminuição dos níveis da enzima β -galactosidase na parede intestinal. Com isso, a hidrólise da lactose pode ser considerada como uma nova operação unitária, que pode ser integrada transformando diversas matérias-primas contendo lactose (PESSELA et al., 2003).

A enzima também é capaz de realizar reação de transferência (transgalactosilação) do resíduo galactosil com a formação de uma variedade de di-, tri-, e oligossacarídeos chamados de galacto-oligossacarídeos (GOS) (PARK e OH, 2010). Porém, sua aplicação não é restrita ao de produtos lácteos, sendo relatada atuação em diversas áreas como medicina, biologia molecular, biomarcadores, genética, ciência da vida, indústria alimentícia, entre outros, conforme Figura 1 (SHARMA, 2017).

Figura 1: Áreas de aplicação da β -galactosidase (Adaptado de SHARMA, 2017).



Como exemplos de aplicação tem-se o uso em suplemento alimentar de aves (ARAÚJO et al., 2008), biomarcador de câncer de ovário (XIANGZHU et al., 2019) e de osteoartrite (WANG et al., 2017), indicador de amadurecimento de frutos (LIMA et al., 2006), marcador de senescência de células somáticas (TOKMAKOV e SATO, 2019), produção de prebióticos (SILVÉRIO et al., 2017), bioindicador de contaminantes *E. Coli* (WANG et al., 2017), entre outras.

Enzimas podem ser imobilizadas por diferentes métodos, tais como: encapsulação em membranas poliméricas; ou em matrizes poliméricas; adsorção em materiais insolúveis hidrofóbicos ou em resinas de troca iônica; ligação covalente a uma matriz insolúvel ou por reticulação.

Nos últimos 5 anos, foram publicadas mais de 43.000 pesquisas referentes à enzimas imobilizadas (busca realizada no Scopus da CAPES com o termo de pesquisa "*immobilized enzymes*"). Observa-se que, um processo eficiente de imobilização é afetado pelas características da enzima, do suporte e do método empregado (CANTONE et al., 2013), sendo suporte o principal contribuinte para o bom desempenho de um sistema de imobilização (MENDES et al., 2011).

De acordo com sua origem, os suportes podem ser classificados como materiais orgânicos e inorgânicos. Quanto à sua morfologia, podem ser porosos, não porosos e de estrutura em gel. Existem suportes orgânicos naturais já consagrados considerando o grande número de trabalhos publicados, todavia, não existe um método ou suporte de imobilização único aplicável a todas as enzimas e suas várias aplicações, dependendo das características particulares da enzima e das condições de uso de enzima imobilizada, com isso, novos suportes têm sido utilizados e muito pouco se sabe sobre eles ou não são reportados na literatura. O estudo de suportes

aplicado à enzima β -galactosidase, é importante por conta da sua instabilidade frente às adversidades do meio reacional e sua sensibilidade a mudanças durante os processos, conforme Braga (2012) reforça.

2. OBJETIVOS

O objetivo geral deste Trabalho de Conclusão de Curso é investigar suportes utilizados na imobilização da enzima β -galactosidase disponíveis na literatura.

Para a abordagem da meta proposta, os objetivos específicos são definidos a seguir:

- Estudar a enzima β -galactosidase: definição, origem, aplicações;
- Analisar as técnicas mais aplicadas na imobilização enzimática;
- Avaliar a literatura sobre recentes tipos de suportes utilizados para a imobilização da enzima β -galactosidase;
- Comparar os métodos selecionados.

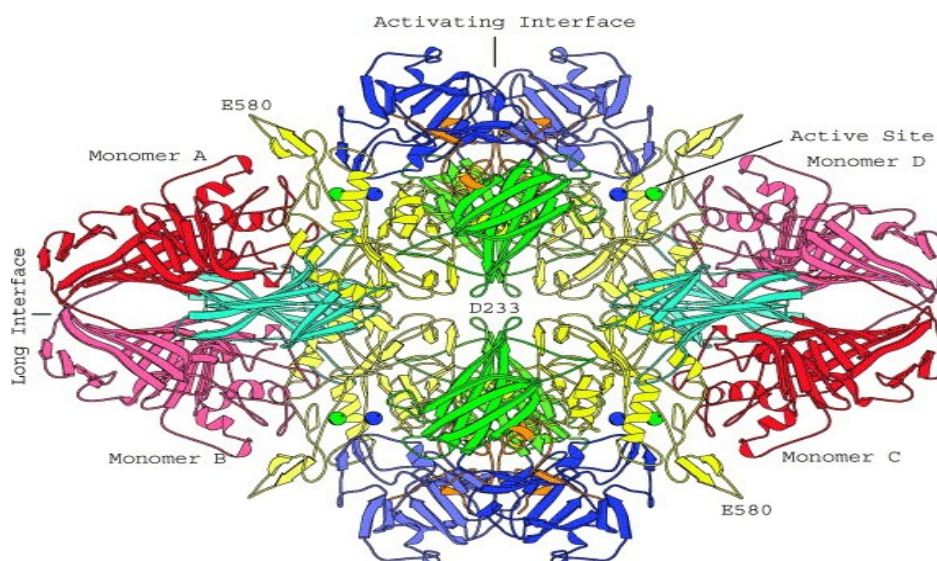
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. β -galactosidase

Segundo Chibata (1978), enzima é um tipo de substância orgânica, em geral proteínas, com atividade intracelular ou extracelular em organismos cuja função principal é a de proporcionar a rota com a menor energia de ativação e consequentemente, um curto tempo de reação em condições moderadas de temperatura e pressão. As enzimas podem ser de origem vegetal, animal e microbiana, podendo ser obtidas através de bactérias, fungos filamentosos e leveduras (SANTOS, 2012).

Recentemente, β -galactosidases (EC 3.2.1.23), membros de glicosil hidrolases, são destacados por seus potenciais para a síntese de lactulose através de transgalactosilação (LIAO et al., 2016). É uma enzima da família das hidrolases que catalisa a hidrólise da ligação β -1,4glicosídica da lactose em glicose e galactose (ADAM et al., 2004). A estrutura de β -galactosidase de origem de *E. coli*, é representada na Figura 2 (MATTHEWS, 2005), em que constitui-se por quatro cadeias polipeptídicas, identificadas como A-D, cada uma com cerca de 1023 aminoácidos, conforme o autor afirma.

Figura 2: Vista inferior do tetrâmero β -galactosidase *E. coli*. (MATTHEWS, 2005).



Popularmente conhecida como lactase, atua na obtenção de produtos lácteos com baixo teor de lactose; o que implica em vantagens nutricionais e tecnológicas, e aumenta a doçura dos produtos lácteos. Com isso atua na melhoria da qualidade sensorial de produtos como doce de leite, sorvete e leite condensado, na melhor biodegradabilidade do soro de queijo, entre outros (KLEIN, 2016; PANESAR et al., 2010).

A origem da enzima determina o seu potencial de transgalactosilação e a sua capacidade de empregar moléculas diferentes como aceptores do resíduo galactosil. As β -galactosidases podem ser encontradas na natureza, distribuídas entre vegetais – particularmente em amêndoas, pêssego, damasco, maçã –, em órgãos de animais, como intestino, cérebro, testículos, placenta (FACIN et al., 2015) e também são produzidas por grande quantidade de microrganismos, tais como fungos filamentosos, bactérias e leveduras (FREITAS et al., 2012).

Embora as β -galactosidases de organismos termofílicos (DAABROWSKY et al., 2000; LADERO et al., 2002) e psicofílicos (CAVICCHIOLI et al., 2002) sejam atraentes, as enzimas mesofílicas de *Aspergillus* e *Kluyveromyces*, ambas com GRAS (*Generally Recognized as Safe* - Geralmente Reconhecidos Como Seguros), são os mais adequados para uso industrial (ILLANES et al., 1993). Os primeiros são termoestáveis e têm um pH ótimo entre 3,5 e 5,5 (YANG et al., 1994).

A aplicação industrial de β -galactosidases pode ocorrer de duas maneiras: em solução, com o uso da enzima livre, ou imobilizada via suporte. Sua aplicação em forma livre é tecnicamente simples, porém limita sua reutilização e

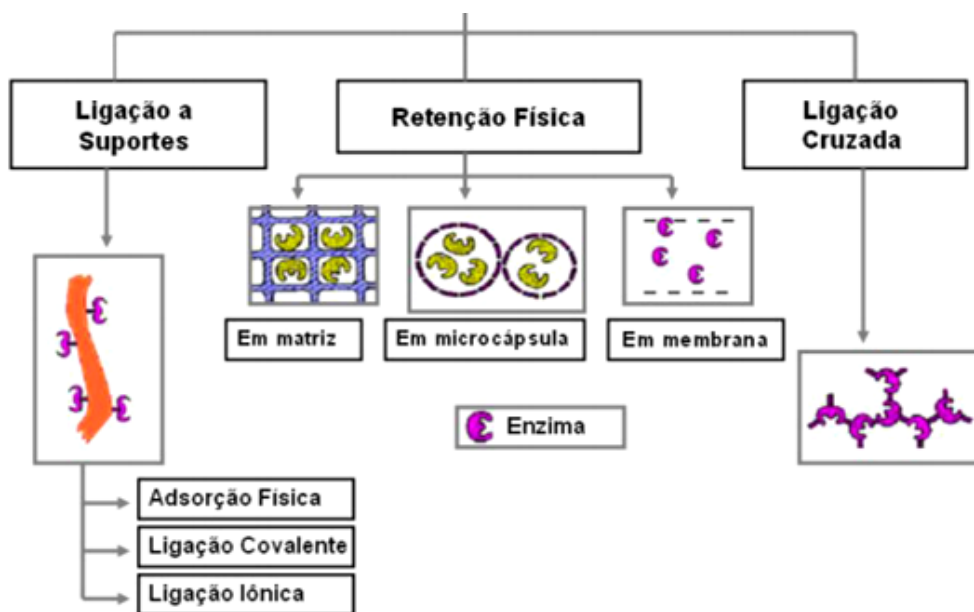
representa um impacto econômico significativo devido ao alto custo de obtenção e purificação de enzimas (OLIVEIRA et al., 2011). Desta forma, as lactases pertencem ao grupo de biocatalisadores cuja imobilização tem despertado crescente interesse, devido ao amplo potencial de aplicação na indústria de alimentos (KLEIN, 2010). Com isto, as técnicas de imobilizações são altamente indicadas como alternativa eficaz para os processos industriais, sendo economicamente viável e produtiva. Os principais métodos de imobilização são abordados na seção seguinte.

3.2. Imobilização

A quantidade de biocatalisadores novos tem aumentado substancialmente acompanhando o desenvolvimento da biotecnologia. Embora muitos possam ser usados como enzimas livres ou como células inteiras, a imobilização acrescenta recursos que podem melhorar significativamente a viabilidade comercial e estabilidade. Algumas das vantagens da imobilização são: a facilidade de separação da enzima e capacidade de reutilização, simplificando a recuperação e reciclagem dos biocatalisadores e reduzindo os custos operacionais (LIU et al., 2012). Segundo Rafael (2014), a imobilização de enzimas possibilita catálises heterogêneas de reações enzimáticas, tendo também vantagens ecológicas, econômicas e toxicológicas de igual importância. Kriznik (2018) cita que além do aumento da atividade das enzimas, a imobilização atua na estabilidade contra valores extremos de pH e altas temperaturas. Outra vantagem é a facilidade nos processos de separação, que podem ser aplicados em tecnologias da vida real, como indústrias de limpeza.

A seleção da técnica de imobilização afeta o desempenho como sensibilidade, seletividade e estabilidade, pois afeta a orientação da enzima, carga, mobilidade, estabilidade e estrutura (SHARMA, 2017). No geral as formas de imobilização podem ser através de: ligação a suportes (adsorção física, ligação covalente, ligação iônica), retenção física (em matriz, microcápsula ou membrana) e via ligação cruzada, conforme apresentado na Figura 3, a seguir:

Figura 3: Métodos para imobilização de enzimas (DALLA VECCHIA et. al, 2004).



Para uma escolha econômica do método de imobilização, é necessário o conhecimento da reação desejada, o processo de aplicação da enzima imobilizada, condições do meio, modificações causadas na estabilidade, atividade, pH e demais fatores. Por conseguinte, é importante conhecer os métodos de imobilização, para uma boa escolha de acordo com o processo. Os principais métodos de imobilização são objetos de abordagem nos subitens seguintes.

3.2.1. Imobilização por Adsorção Física

Em adsorção física, a enzima é imobilizada num transportador insolúvel em água e os biocatalisadores são mantidos na superfície dos transportadores por forças físicas (forças de Van der Waals) (PANESAR et al., 2010). Nesta modalidade, a adesão da enzima em suporte não foi preparada em especial para ligação covalente. Como vantagem tem-se, além da facilidade e simplicidade, a pouca alteração da estrutura conformacional da enzima. Em contraponto, este método é muito sensível ao meio, ou seja, a principal limitação da técnica reside no fato de que existe influência bastante acentuada das condições ambientais promovidas pelo meio de cultivo na capacidade de retenção das células no suporte. Normalmente os fatores que interferem neste método de imobilização são: concentração iônica e pH, conforme Schimidell et al. (2001) menciona.

Pavel et al. (2017) realizaram experimento comparativo utilizando a adsorção, para avaliar a atividade de β -galactosidase em macroporos e

mesoporos, preparado por um método sol-gel a partir de um precursor de sílica e uma dispersão de nanopartículas lipídicas sólidas em uma fase de micela, para aplicações como hidrólise de lactose. Já Gonawan et al. (2015), desenvolveram um procedimento simples envolvendo adsorção e fixação simultâneas para imobilizar β -gal de *Aspergillus oryzae* num módulo de membrana de fibra oca de polissulfona para converter a lactose em GOS.

3.2.2. Imobilização por Ligação Iônica

A ligação iônica utilizada como meio de imobilização, envolve basicamente interações iônicas e eletrostáticas entre íons de proteínas e íons de carga oposta da resina, ou seja, fundamenta-se na atração da enzima pelo suporte que disponibiliza resíduos favoráveis para a troca iônica. Neste tipo de imobilização, a energia compreendida entre o suporte e a enzima é maior, pois as ligações iônicas são mais fortes que as de Van der Waals (adsorção), entretanto, mais fracas do que a ligação covalente.

Algumas das vantagens dessa técnica são: a rapidez do processo de imobilização, simplicidade e a possibilidade de reuso do suporte após a remoção da enzima (HUSAIN, 2010), além do baixo custo, disponibilidade de suportes, pouca mudança conformacional na enzima, o que permite o alcance de derivados imobilizados com altas atividades enzimáticas. Já como principal desvantagem desse protocolo, tem-se que as enzimas podem ser liberadas do suporte durante a reação, por isso é importante à manutenção de força iônica necessária e ao pH da solução em que a enzima imobilizada catalisa a reação, de acordo a afirmação de Lemos (2018). Guidini et al. (2010) realizaram trabalho por meio de método de ligação iônica combinada e reticulação para a imobilização de β -galactosidase de *A. oryzae*. Ali Osman (2014) utilizaram β -gal bifidobacteriana BbglV imobilizada em DEAE-celulose e Q-Sepharose via ligação iônica e em agarose de amino-etilo para catalisar a síntese de GOS.

3.2.3. Imobilização por Ligação Covalente

O método de ligação covalente se baseia na retenção de enzimas na superfície do suporte via formação de ligação covalente. Ocorrem devido a sua cadeia lateral de aminoácidos como lisina, arginina, ácido aspártico, histidina, com

base no grau de reatividade de diferentes grupos funcionais como imidazol, indol, fenólico, hidroxil, como estudado por Cowan e Fernandez-Lafuente (2011).

A imobilização covalente proporciona uma ligação mais duradoura e evita a perda por lixiviação quando entra em contato com o solvente, aumentando assim a estabilidade a longo prazo (PAGAN et al., 2015). Dentre os métodos de imobilização disponíveis, a ligação covalente é o mais efetivo em termos de estabilização térmica e operacional das enzimas (MANRICH et al., 2008). Este tipo de imobilização é condicionado pela presença de funções reativas no suporte para uma boa fixação da enzima (ALI et al., 2015). A desvantagem desta técnica é que para a ativação de grupos funcionais presentes no suporte, ocorrem o uso de elementos orgânicos, o que possibilita a desnaturação proteica. Contudo, a possibilidade de redução de custos de produção por meio da recuperação e reutilização de enzimas imobilizadas covalentemente potencializa sua aplicação, (MILETIC et al., 2012, *apud* Rafael, 2014). Como exemplo de aplicação, tem-se a pesquisa de Kriznik et al. (2018) em que β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* foi ligada covalentemente a amino-silano e quitosana MNPs., visando aplicação em processos biotecnológicos em especial, na área de química verde.

3.2.4. Imobilização por Encapsulamento

O método por encapsulamento consiste em proteger os biocatalisadores em um único compartimento de volume definido, que representa um microambiente separado do ambiente externo conforme citado por Ficanha et al. (2015).

Uma característica deste método, que também o torna vantajoso, é a manutenção da mobilidade da enzima, devido à não existência de ligações químicas ou físicas entre a enzima e o suporte. Pode ocorrer via retenção do biocatalisador por membrana porosa ou por formação de estrutura porosa tridimensional envolvendo a enzima. Pradella et. al. (2001) mencionam sobre as vantagens estabelecidas pelo entrecruzamento, também conhecido como envolvimento, como sua facilidade, baixíssima toxidez e alta capacidade de retenção celular. O maior fator limitante desse processo é a velocidade com qual o substrato e os produtos formados difundem-se através da membrana. Estevinho et al. (2014) publicaram a pesquisa sobre imobilização de β -galactosidase usando a técnica de encapsulamento com goma arábica, quitosana, quitosana modificada, alginato de cálcio e alginato de sódio.

3.2.5. Imobilização por Ligação Cruzada

Nesse método, através de recurso de um agente multifuncional, as enzimas são ligadas vigorosamente entre si. É primordial nesta técnica de imobilização a seleção de um reagente que promova a ligação entre grupos não envolvidos na catálise e que esteja em concentração suficiente para a completa imobilização e manutenção da atividade enzimática (CARVALHO et al., 2015).

Este método é livre de suporte, quando estudado isoladamente, e as enzimas estão ligadas umas às outras, ou a proteínas inativas (gelatina, albumina), formando uma estrutura tridimensional complexa (CARDOSO et al. 2007). Consiste na formação de inúmeras ligações cruzadas criando uma rede tridimensional de moléculas de enzima. Ocorre com o uso de agentes bifuncionais ou multi-funcionais, (diaminas alifáticas ou glutaraldeído) que estimulam a auto-reticulação das enzimas. Contudo, a ligação cruzada é comumente aplicada como uma associação à outras técnicas de imobilização. Como desvantagem, este método sofre limitações devido à difusão e dificuldade do controle da formação das ligações, além da pequena retenção da atividade e a estabilidade mecânica reduzida, o que implica na aplicação industrial. Já a maior vantagem, é a simplicidade do método.

Tanriseven e Dogan (2002) usaram glutaraldeído como agente “*cross linking*” na imobilização da β -galactosidase em alginato e gelatina. Ribeiro et al. (2019) realizaram imobilização da enzima invertase SBA-15 em diferentes moléculas orgânicas como agentes funcionalizantes ancorados nos grupos silanol presentes na superfície de materiais mesoporosos como o SBA-15, através diferentes tipos de imobilização, entre eles via reticulação (ligação cruzada).

Considerando os métodos de imobilização apresentados neste Trabalho, pode-se notar que o uso de suporte é bem aplicado para imobilizar enzimas. Portanto, o assunto “suporte” é dissertado, a seguir.

3.2.6. Materiais utilizados como suportes para imobilização

Braga (2012) ressalta que tão importante quanto o método de imobilização é a escolha do suporte. O binômio suporte–método mais adequado será aquele que propiciar uma maior atividade após imobilização. Consequente, serão tratados de maneira geral, algumas considerações referentes à suportes aplicados à imobilização enzimática.

É importante lembrar que, dependendo das condições de imobilização e dos suportes empregados, a enzima apresentará diferentes propriedades finais, podendo alterar, por exemplo, sua estabilidade frente ao pH e temperatura (ALMEIDA et al., 2008). A seleção do suporte contendo alta concentração de grupos reativos para permitir a ligação suporte enzima e ao mesmo tempo em que preservam a estrutura multimérica é um passo muito importante (BOLÍVAR et al., 2009). A boa escolha do suporte deve levar em consideração algumas características fundamentais para o sucesso da imobilização, entre as quais, ser: de custo baixo, estável frente aos parâmetros do processo, resistente ao ataque microbiológico, natureza hidrofílica ou hidrofóbica, regenerável (para serem utilizados em nova imobilização), ser inerte (não reativo com a enzima), facilidade de manuseio, química e mecanicamente estáveis, compreender grupos químicos que podem ser ativados ou modificados (em especial para aplicação de ligação covalente, que pode sugerir a mudança da superfície do suporte), elevada área superficial e ser altamente poroso.

Souza et al. (2017) relatam que a eficiência de um protocolo de imobilização é determinada levando em consideração alguns parâmetros como : cálculo da concentração de proteína imobilizada, (PI), cálculo da atividade recuperada (AR), cálculo do fator de estabilidade (FE); cálculo do rendimento de imobilização (RI), o que retrata também, o sucesso do suporte aplicado.

A classificação dos suportes, de acordo com a origem, é dada como materiais orgânicos e inorgânicos. Já levando em consideração sua morfologia, classificam-se em porosos e não porosos.

Tabela 1: Classificação de suportes de acordo com sua origem (GALVÃO, 2004).

Orgânicos		Inorgânicos		
Naturais		Sintéticos	Minerais	Fabricados
Ágar	Albumina	Nylon	Areia	Aluminossilicato
Agarose	Colágeno	Poliacrilamidas	Bentonita	Cerâmica
Amido	Gelatina	Poliacrilatos	Homeblenda	Óxido de Ferro
Celulose	Proteínas	Poliamidas	Pedra- Pome	Sílica
Polissacarídeos	Seda	Poliestireno		Vidro
Quitosana		Polivinilos		
		Vinil		

Devido à especificidade de cada processo e as inúmeras formas de imobilização com a combinação de diferentes suportes, foram feitas investigações

na literatura e os trabalhos mais recentes no que se trata de suportes destinados à β -galactosidase são descritos no capítulo 4.

4. SUPORTES UTILIZADOS EM IMOBILIZAÇÃO DE β -GALACTOSIDASE

Inúmeros trabalhos relatados na literatura usam diferentes tipos de técnicas de imobilização aplicando variados suportes. Neste capítulo, são citados recentes e relevantes estudos acerca da imobilização da β -galactosidase em ordem cronológica.

4.1. Imobilização da β -galactosidase em nanopartículas magnéticas recobertas com quitosana e sua aplicação na síntese de galacto-oligossacarídeos à base de lactulose

Nguyenet al. (2019) imobilizaram covalentemente β -gal em nanopartículas magnéticas revestidas de quitosana ativadas com gutaraldeído como potencial aplicação na produção de GOS. Os valores ótimos de conteúdo de proteína foi 0,45 mg/mL, pH em 4,9 e tempo de rendimento em 4,9 horas. Com a imobilização, a estabilidade da enzima subiu de 2,5 para mais de 6 dias de meia vida à 60°C. A atividade enzimática permaneceu em 85% após 8 ciclos de uso à 60°C, pH 4,5 por 4h. Já o rendimento máximo de atividade da enzima, teve o valor máximo de 98,8%. Os autores variaram as concentrações iniciais de lactulose entre 0,58 e 2,34 M, para a síntese de GOS e com alimentação de 2,34M às 36h de reação, obteve-se o rendimento máximo de 17% mol/mol de GOS.

4.2. Sondando o confinamento de β -galactosidase em sílica mesoporosa por espectroscopia Raman

O trabalho apresentado por Prazeres et al. (2019) intitulado “Sondando o confinamento de β -galactosidase em sílica mesoporosa por espectroscopia Raman” apresenta a imobilização de β -gal em sílica não porosa e em macroporos. Através da espectroscopia Raman, foi estudada a adsorção específica da enzima em materiais de sílica meso-macroporosa, de poros interconectados de 9nm e macroporos de 20 nm. Após análise dos resultados, os autores verificaram indicativos de uma fissorção preferencial em macroporos. Ao aumentar a concentração de enzima, foi notado confinamento em mesoporos. Concluíram que

propriedades texturais dos materiais de sílica parecem ser fator chave na adsorção enzimática.

4.3. Quelação por colágeno na imobilização de β -galactosidase de *Aspergillus oryzae*: um biocatalisador potencial para hidrolisar a lactose por processos descontínuos

Gennari et al. (2018) publicaram um estudo sobre a quelação por colágeno na imobilização da β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* como um biocatalisador potencial para hidrolisar a lactose por processos em batelada. O trabalho inédito neste estudo de acordo com os autores expõe a imobilização de β -galactosidase usando o colágeno em pó (Col) como matriz, formando quelato com alumínio. Também foi realizado o tratamento com colágeno incluindo ácido acético, glutaraldeído e uma combinação de alumínio e glutaraldeído (Col-Al-Glu-Gal). Os derivados gerados foram Col-HAc-Gal (β -gal imobilizada em colágeno tratado com ácido cético), Col-Glu-Gal (β -gal imobilizada em colágeno tratado com glutaraldeído), Col-Al-Ga (β -gal imobilizada em colágeno tratado com sulfato de alumínio) e Col-Al-Glu-Gal (β -gal imobilizada em colágeno tratado com combinação de sulfato de alumínio e glutaraldeído).

Os resultados obtidos indicaram imobilizações de rendimento elevado (superior a 80%) e alto padrão de eficiência (superior a 99%), com cargas de proteínas variando de 500 à 1200 mg/gde suporte. Porém, os valores de K_M aumentaram e a velocidade da reação, diminuiu. Os perfis de temperatura da enzima livre e imobilizada mantiveram-se semelhantes, ao passo que o valor ótimo de pH foi de 5,0 para 6,0 quando imobilizadas. Os derivados de Col-Al-Gal e Col-Al-Glu-Gal sustentaram alta atividade enzimática na hidrólise descontínua da lactose em soluções de permeado e lactose por 50 e 60 ciclos, respectivamente. A estabilidade térmica foi avaliada para investigar a aplicabilidade da enzima imobilizada em escala industrial e todos os derivados exibiram tempos de meia vida superiores aos da enzima livre. Depois de imobilizada, a enzima manteve atividade enzimática elevada em cerca de 50 a 60 ciclos de uso.

4.4. Preparação, caracterização e liberação *in vitro* de nano partículas de polieletrólito carregadas com β -galactosidase

Por meio do trabalho "Preparação, caracterização e liberação *in vitro* de nano partículas de polieletrólito carregadas com β -galactosidase", Hongcai Zhang et al. (2018) prepararam nanopartículas de β -quitosana (CS) carregadas com β -gal (NPs) via técnica de gelificação iônica e atração eletrostática para melhorar a eficácia da encapsulação e a capacidade de liberação *in vitro*, relatado como primeiro deste tipo via uso de nanopartículas de β -quitosana.

Com o intuito de contornar o problema associado ao tratamento de intolerância à lactose, no qual suplementos comerciais de β -gal tem baixa eficácia de utilização devido à rápida inativação, e apenas uma pequena quantidade das moléculas permanece disponível após a administração oral, foi realizado este estudo. O tamanho de partículas de β -gal carregadas com baixo e alto peso molecular β -CS NPs atingiram 584,37 e 652,46 nm, com potencial zeta de 26,37 e 16,46 mV sob condições ótimas. As NPs preparadas quase não apresentaram citotoxicidade na faixa de 0,1 a 1,0 mg mL⁻¹. Já os estudos de liberação *in vitro* realizado em pH 4,5 e 7,4 mostraram que as NPs com baixo e alto peso molecular β -CS carregadas com β -gal, atingiram eficácia de encapsulação de 68,32 e 58,64% e sustentaram a liberação da β -gal ao longo de 12 horas. Os autores defendem que NPs de β -CS carregados com β -gal, podem servir como transportadores de distribuição não tóxicos para aplicação no tratamento da intolerância à lactose.

4.5. Estudo da imobilização de β -galactosidase de *Aspergillus oryzae*, *Kluyveromyces lactis* e *Saccharomyces marxianus var lactis* em matriz de alginato de cálcio, gelatina e transglutaminase

Darif (2018) estudou a imobilização de β -galactosidases comerciais via gelificação iônica de alginato-gelatina-TGase e em esferas e lentes de PVA-Lentikats®. Em relação à atividade da β -galactosidase, o alginato tipo III (14000 cP Sigma-A7128 [M/G=1,56]) foi o que se sobressaiu em relação aos parâmetros averiguados. Foi verificado que a inclusão de gelatina e transglutaminase para a imobilização em alginato, impactaram de maneira positiva na retenção da atividade enzimática, em detrimento à enzima livre. A imobilização feita em esferas e lentes de PVA-Lentikats® forneceu baixa atividade.

As β -galactosidases A e B neutras (*Kluyveromyces lactis*) tanto livres como imobilizadas em alginato de cálcio-gelatina-TGase obtiveram 35°C em pH de 7,0 como condições de temperatura e pH ótimos de atividade. Já 40°C e pH de 7,0 foram as encontradas para a denominada β -galactosidase C (*Saccharomyces marxianus* var. *lactis*), tanto imobilizada quanto na forma livre. E para D (*Aspergillus oryzae*), a temperatura ótima para a atividade foi de 50°C e pH 4,5, enquanto imobilizada, e 45°C e pH 4,5 para a forma livre. Também foi avaliado a reutilização da β -galactosidase neutra C e β -galactosidase ácida D imobilizadas. A espécie C, após 3 bateladas de 6h cada, a 35°C apresentou atividade enzimática de cerca de 75,6% via imobilização em alginato de cálcio-gelatina-TGase, e na 5ª batelada, este valor caiu para 42% e, para a 10ª, foi para 12% de atividade, respectivamente. Já a β -galactosidase D, através da mesma imobilização e condições de operação com temperatura de 45°C, obteve 77% de atividade após 3 bateladas de 6 horas, e a atividade caiu para 62% e 37%, na 5ª e 10ª batelada, respectivamente.

4.6. Melhoria da atividade recuperada e estabilidade da β -galactosidase *Aspergillus oryzae* imobilizada em Duolite A568 por combinação de métodos de imobilização

Falleiros et al. (2017) imobilizaram β -gal originada de *A. oryzae* em Duolite A568 através da associação da adsorção física, em incubação tampão (pH 9,0) e *cross-linking* com glutaraldeído. O método baseou-se em combinar métodos de imobilização simultaneamente para imobilizar a enzima, em três etapas: imobilização por adsorção em resina, incubação a pH 9,0 e reticulação utilizando glutaraldeído.

A atividade da enzima aumentou em 44%, em comparação com biocatalisador resultante da imobilização. A estabilidade do biocatalisador proposto foi maior do que o de dois passos (adsorção e reticulação) e também em relação à enzima livre. Já em relação à estabilidade térmica, a faixa compreendida está entre 55 a 65°C. Ao que se refere à cinética térmica de desativação, foi definida como de primeira ordem com energia de ativação e desativação térmica de 71,03 kcal·mol⁻¹ e 5,48h como tempo de vida na temperatura de 55 °C, e estabilidade muito boa com pH variando de 1,5 à 9, para a imobilização sugerida. Os autores concluíram que a imobilização de β -galactosidase com uso de adsorção, incubação em tampão pH 9 e reticulação, respectivamente, suportado por Duolite A568 foi a combinação que

forneceu a melhor atividade e estabilidade, equiparado ao biocatalisador alcançado via adsorção e reticulação apenas. Sendo assim, o mais interessante para a aplicação industrial.

4.7. Imobilização de β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* em matriz de agarose funcionalizada por quatro diferentes métodos e aplicação na síntese de lactulose

Uma maneira alternativa de avaliar o uso de suporte é variando-se o tamanho da molécula. Guerrero et al. (2017), utilizaram deste recurso para imobilizar β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* em matriz de agarose e funcionalizada por quatro diferentes métodos, para determinação do efeito do tipo de imobilização sobre o rendimento e especificidade da síntese de lactulose a partir de lactose e frutose. Os métodos citados no título se referem aos quatro diferentes suportes utilizados para a imobilização multi-pontual covalente da β -gal: glioxil-agarose (GA), amino-glioxil-agarose (Am-GA), carboxil-glioxil-agarose (Cx-GA) e quelato-glioxil-agarose (Che-GA).

A variação da morfologia do suporte foi o mecanismo aplicado para testar as propriedades do biocatalisador, via uso de agarose de três tamanhos diferentes: fino (20-50 μ m), padrão (50-150 μ m) e macro (150-350 μ m) e cinco graus de reticulação (2, 4, 6, 8 e 10%) como suportes de imobilização. As enzimas imobilizadas em todos os tamanhos e cargas de proteínas demonstraram maior estabilidade que a enzima livre, sendo que a carga proteica não afetou a estabilidade. Em face de todas as análises feitas, o tamanho das partículas teve um forte efeito sobre o rendimento de imobilização expressa e a atividade específica para todos os biocatalisadores. Já a atividade específica e estabilidade de Am-GA-AOG foram altas; 7700 U/g, onde U= micromol por segundo; e rendimento de imobilização, em 39, 4%. Entretanto, o rendimento de lactulose e seletividade de lactulose, que representa a razão molar de lactulose para TOS no meio reacional, foram menores do que as encontradas com relação a GA-AOG, embora a maior parte entre os suportes heterofuncionais. E também, maiores rendimentos de lactulose e seletividade foram os obtidos com GA-AOG.

4.8. Adsorção simultânea e fixação de β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* na membrana de fibra oca polissulfona em camadas de polieletrólito

Seguindo a imobilização de β -gal derivada de *Aspergillus oryzae*, Gonawan et. al (2016) apresentam o trabalho “Adsorção simultânea e fixação de β -galactosidase *Aspergillus oryzae* na membrana de fibra oca polissulfona em camadas de polieletrólito”. O estudo envolveu adsorção e fixação simultânea para imobilizar a β -galactosidase em módulo de membrana de fibra oca de polissulfona para converter lactose em GOS. O sistema se baseou em polietilenimina usada como camada intermediária de polieletrólito para favorecer a adsorção de β -gal, sendo então esta fixada com com glutaraldeído por reticulação.

Os resultados mostraram que o rendimento da atividade na superfície da membrana, aumentou proporcionalmente à concentração de β -gal utilizada durante a adsorção. A fixação segue o mesmo comportamento. A concentração ótima de polietilenimina e glutaraldeído foi de 5%(v/v) e 15%(v/v), respectivamente. O maior rendimento de atividade obtido foi de 1,26 U cm⁻² a 5 m/mL da concentração de β -gal. Aliás, a β -galactosidase imobilizada exibiu maior produtividade específica e atividade de transgalactosilação estável em comparação com a enzima livre durante a reação de conversão catalisada para a produção de lactose.

4.9. Síntese de galacto-oligossacarídeos prebióticos de lactose usando β -galactosidase bifidobacteriana (BbgIV) imobilizada em DEAE-Celulose, Q-Sepharose e amino-etil-agarose

A catálise da síntese de GOS também foi estudada com outro tipo de suporte. Ali Osman et al. (2014) propuseram síntese de galacto-oligossacarídeos prebióticos de lactose usando β -galactosidase bifidobacteriana (BbgIV) imobilizada em DEAE-Celulose, Q-Sepharose e amino-etil-agarose. Utilizando ligação iônica para imobilizar a β -galactosidase em DEAE celulose e Q-Sepharose e em agarose de amino-etilo e amino-glioxal por ligação covalente, e posteriormente, foram usados para a catálise da síntese de galacto-oligossacarídeos (GOS).

O rendimento máximo de produto usando tanto DEAE-Celulose quanto Q-Sepharose e BbgIV livre foi o mesmo, com valores de 49-53%, o que indica ausência de limitação de difusão e transferência de massa. O rendimento de imobilização superou 90% via ligação iônica, em relação à ligação covalente. Em relação à estabilidade operacional do BbgIV e a produtividade da síntese do

prebiótico, estes dois parâmetros aumentaram até quando o processo atingiu a temperatura de 55 °C. Entretanto, para amino-etil-agarose, a produção de GOS obtida foi menor (42-44%) comparada com a enzima livre.

4.10. Melhoria da derivatização de quitosana para a imobilização da β -galactosidase de *Bacillus circulans* e sua posterior aplicação na síntese de galacto-oligossacarídeos

Seguindo como foco a síntese de galacto-oligossacarídeos, tem-se o trabalho realizado por Urrutia et al. (2014). Nesta pesquisa, os autores utilizaram dois suportes derivados de quitosana. No primeiro caso, a quitosana foi derivatizada por reticulação com glutaraldeído e ativada com epicloridrina. Já no segundo tipo de suporte, também com o uso de epicloridrina, foi feita a reticulação e a ativação. Este processo foi realizado em duas etapas: favorecendo a reticulação do suporte, e após, foi feita a funcionalização do suporte (C-EPI-EPI). Os grupos epóxidos foram oxidados e hidrolisados resultando em dois suportes ativados com diferentes concentrações de aldeído (100-250 $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$). Considerando a atividade expressa e a estabilidade térmica, o melhor suporte foi o C-EPI-EPI com 200 μmol de grupos de aldeído por grama de suporte.

O rendimento da imobilização em relação à atividade e proteína foram de 17,3% e 61,5%, respectivamente. O biocatalisador obtido foi de 280UI/g e alta estabilidade térmica, sendo a meia vida 449 vezes o valor da enzima solúvel. Quando aplicado à síntese de GOS em batelada repetida, a partir do quarto lote sucessivo é que se obteve produtividade específica cumulativa superior ao obtido com uso de enzima livre.

4.11. Microencapsulação de β -galactosidase com diferentes biopolímeros por um processo de secagem por pulverização

Devido ao grande número de polímeros existentes, aplicação de suportes dessa origem também se torna interessante. Estevinho et al. (2014) investigaram a produção de micropartículas contendo β -galactosidase (*Escherichia coli* da marca Calbiochem) empregaram diferentes polímeros como suportes gerando agentes encapsulantes. O intuito foi a aplicação em técnicas de liberação controlada de enzimas em indústrias alimentar, farmacêutica, química e de tratamento de resíduos. Os materiais usados foram goma arábica, quitosana, quitosana modificada, alginato

de cálcio e alginato de sódio. Nos experimentos, a atividade de β -galactosidase microencapsulada diminuiu com todos os biopolímeros (quitosana, alginato, goma arábica).

A comparação da atividade específica forma solúvel e da β -gal imobilizada, forneceu valores de 27, 20, 20 e 13% usando como suportes goma arábica, quitosana modificada, alginato de cálcio e alginato de sódio, respectivamente. Em relação à velocidade máxima da reação, $V_{m\acute{a}x}$, as micropartículas de enzimas imobilizadas com goma arábica tiveram menor interferência no parâmetro, no que se refere ao decréscimo deste valor, seguido de alginato de cálcio, alginato de sódio e quitosana modificada. O potencial zeta (estabilidade do sistema coloidal) também foi avaliado, resultando na ordem crescente de estabilidade: goma arábica, quitosana, quitosana modificada, alginato de cálcio e alginato de sódio, e em comparação com a enzima livre, todos os suportes propostos forneceram sistemas estáveis. A respeito da morfologia, as microcápsulas produzidas pelos biopolímeros resultaram em formas esféricas e com diâmetro em torno de $3\mu\text{m}$. As partículas formadas com quitosana ou goma arábica, apresentaram superfície muito áspera, em contraponto, as partículas oriundas de alginato de cálcio ou sódio e quitosana modificada, constituíram-se de superfície lisa.

4.12. Otimização do processo de imobilização da β -galactosidase por reticulação combinada de armadilhas e pela cinética da hidrólise da lactose

Freitas et al. (2012) relatam a imobilização de β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* via método de aprisionamento em alginato de sódio e gelatina e reticulação com glutaraldeído aplicados na hidrólise de lactose. Para isto, foram diversificadas as concentrações de alginato, gelatina e glutaraldeído. Outro objetivo do trabalho foi investigar a cinética de hidrólise da lactose em relação às concentrações de lactose e produto. Para verificar a influência da concentração de lactose(substrato) na atividade da enzima, foi variada a concentração numa faixa de 10 a $100\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. Também realizaram estudo da influência da concentração inicial de lactose, glicose e galactose (produtos da reação). Os valores utilizados foram 10 a $56\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ para lactose, entre 0 e $11,5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ para os produtos.

O desempenho dos suportes propostos foi verificado através da análise de alguns parâmetros. As concentrações de alginato, gelatina e glutaraldeído que alcançaram os maiores valores para atividade da β -galactosidase foram 6,60%, 4,05% e 3,64% (p/v), respectivamente. Agora, em relação à influência da quantidade de substrato e produtos, os autores concluíram que a glicose em nada influencia a atividade da enzima. Entretanto, a concentração de lactose, não inibiu a atividade de β -gal. E em relação à galactose, foi analisado qual modelo de inibição enzimática se adequou mais, e neste caso, foi o proposto por Michaelis-Menten com inibição competitiva. Os valores de constante de Michaelis-Menten (K_m) e para inibição (K_i) encontrados foram, 48,83 e 53,33 mM, respectivamente e 51,49 e 5,64 mM, nessa ordem, para a enzima livre. Ao que se refere à estabilidade da enzima, após 25 usos, a atividade permaneceu em 80% após a β -galactosidase imobilizada.

5. DISCUSSÃO

Os trabalhos científicos abordam o tema “suporte” realizando investigações acerca de novos suportes e, sugerindo modificações em suportes e técnicas existentes.

Os principais aspectos que todos os artigos e teses supracitados buscaram, foi o aumento do rendimento específico e a estabilidade térmica da enzima, em face da β -galactosidase livre. Todos os trabalhos atingiram este objetivo com porcentagens que variam de 17 a 99%. De fato, o que comanda o uso do suporte é o conjunto de fatores que estão associados à aplicação.

É incontestável a abundante aplicação de imobilização de β -galactosidase em hidrólise de lactose. Isto pode ser feito imprimindo mudanças apenas na morfologia, conforme Guerrero et al. (2017), que variou o tamanho da molécula enzima-suporte de agarose e os graus de reticulação, concluindo que há um grande efeito, de formas variadas, na atividade da enzima. Freitas et al (2012) também enfocam nesta aplicação, entretanto, utilizam o recurso de variação na concentração dos materiais aplicados como suportes.

Outra possibilidade é o uso do mesmo material para obter diferentes derivados, sendo o método de obtenção do suporte, a chave deste recurso. Tal tática foi usada por Urrutia et al. (2014) na preparação da quitosana via reticulação, dando origem a dois suportes distintos. O tempo de meia vida do suporte obtido indica a eficácia do procedimento: 449 vezes o valor da enzima livre. Esta técnica é

interessante quando já se tem estoque de um determinado material para aplicação de imobilização.

Estevinho et al (2014) usa também este método, aplicando quitosana e quitosana modificada, entre outros, como suporte. Contudo, se baseiam no uso de materiais poliméricos e no método de encapsulação para a liberação controlada de β -galactosidase. Neste trabalho, o que se pode perceber, é que a natureza da matriz, reflete extremamente no suporte formado, uma vez que quitosana e goma arábica resultaram em moléculas de superfície áspera e as demais, lisa, sendo todas estáveis e com rendimentos maiores do que os com enzima livre. Genari et al. (2018) também contempla este recurso: a aplicação de formas diferentes de materiais, combinados com tratamento de mais de uma substância ao longo da preparação do suporte, com o seu suporte destacando-se com maior eficiência dentre os citados neste Trabalho de Conclusão de Curso, com o valor em torno 99%.

Inovações que tentam contornar problemas de estabilidade apontam como que em determinadas aplicações, não só o rendimento é importante, mas outros fatores ponderam o sucesso da imobilização. Isto foi visto em Hongcai Zhang et al. (2018), que trazem a proposta de aplicação de β -galactosidase imobilizada no tratamento de intolerância à lactose, em que a eficácia fica em torno de 58%, entretanto, baixíssimo nível de citotoxicidade ao organismo são apresentadas pelas nanopartículas obtidas para serem digeridas como medicação.

Comparativos de mesmo método e suporte para enzimas de fontes diferentes, segundo a abordagem de Darif (2018) para suportes comerciais é uma maneira muito interessante de analisar e aproveitar suportes já disponíveis no mercado. Contudo, de modo geral, os estudos abordados no capítulo anterior, em sua maioria, utilizam a enzima de origem *Aspergillus oryzae*. Falleiros et al. (2017) também avaliou um suporte comercial fixando a origem da enzima, propondo diferentes combinações de técnicas de imobilização.

No que se diz respeito ao uso de β -galactosidase também é notória a grande aplicação à hidrólise de lactose para a produção de GOS. Além de Urrutia et al. (2014), Ali Osman et al. (2014) propõe outro método, via ligação iônica e covalente, obtendo altos rendimentos. Freitas et al. (2012) também avaliaram o efeito na hidrólise de lactose, variando as concentrações dos suportes utilizados para aprisionamento da β -galactosidase, sendo um caminho possível para

verificação do êxito da imobilização proposta. Gonawan et al. (2016) reforçam o destaque de produção de prebiótico galacto-oligossacarídeos, variando a concentração de agentes preparatórios do suporte.

De maneira geral, analisando a natureza dos suportes aplicados à imobilização de β -gal em diferentes configurações citadas no presente Trabalho, nota-se que em sua maior parte, são de origem natural. Apesar de os polímeros sintéticos apresentarem grandes vantagens devido à sua versatilidade física e química, a autora infere que, fatores como baixo custo e biodegradação, interferem nesta escolha. Considerando também o grande uso da β -gal na área alimentícia, o uso de materiais naturais reflete tanto na questão ambiental e econômica, quanto no que diz respeito à segurança alimentar. Outro detalhe observado, foi o fato de não haver certa periodicidade nas publicações referente ao tema abordado, o que possivelmente pode ser em função de estudos nesta área dependerem de recursos financeiros mais elevados, em detrimento à outras linhas de pesquisa.

6. CONCLUSÃO

O recurso de imobilização da enzima β -galactosidase via uso de suportes físicos é abordado na literatura, sendo reportadas pesquisas que usam métodos de imobilização variando profusas condições.

Os critérios similares e mais relevantes analisados para a verificação do sucesso do suporte foram rendimento específico, estabilidade térmica e o reaproveitamento da enzima. Parâmetros como pH, modo de preparo do suporte, tamanho do suporte, densidade mássica, aspecto morfológico do suporte, natureza de origem da enzima e do suporte, ordem de ativação do suporte, agentes ativantes e método de imobilização foram estratégias usadas nos estudos. Tais técnicas foram aplicadas aos suportes encontrados, via pesquisa bibliográfica, e mencionados neste Trabalho de Conclusão de Curso, aos materiais: sílica, colágeno em pó, quitosana, quitosana modificada, alginato-gelatina TGase, esferas e lentes de PVA-Lentikats®, agarose, fibra oca de polissulfona, DEAE celulose, Q-Sepharose, quitosana, goma arábica, quitosana modificada, alginato de cálcio, alginato de e sódio e Duolite A568. A grande fonte de β -galactosidase foi *Aspergillus oryzae*, dentre os casos avaliados. A maior parte dos estudos analisados enfoca na hidrólise de lactose e síntese de GOS, diversificando materiais e técnicas de preparação.

Entretanto, é evidente que a resposta para a escolha do suporte está na aplicação, que pode ser tão variada quanto sua concepção. Deste modo estudos de novos suportes são primordiais para o desenvolvimento de biocatalisadores estáveis, baratos, fáceis de usar, biocompatíveis e seguros para utilização em industrial.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAM, A. C.; RUBIO-TEXEIRA, M.; POLAINA, J. Lactose: The milk sugar from a biotechnological perspective. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 44, n. 7-8, p. 553-557, 2004.

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

ALI, G.; DULONG, V.; GASMI, S. N.; RIHOUEY, C.; PICTON, L.; LE CERF, D.; Covalent immobilization of pullulanase on alginate and study of its hydrolysis of pullulan, **Biotechnology Progress**, v. 3, p.883-889, 2015.

ALMEIDA, R. V.; BRANCO, R. V.; PEIXOTO, B.; LIMA, C. D. S.; ALQUERES, S. M. C.; MARTINS, O. B.; ANTUNES, O. A. C. e FREIRE, D. M. G. Immobilization of a recombinant thermostable esterase (Pf2001) from *Pyrococcus furiosus* on microporous polypropylene: isotherms, hyper activation and purification. **Biochemical Engineering Journal**, v. 39, n. 3, p. 531-537, 2008.

ARAÚJO, D. M.; SILVA, J. H. V.; MIRANDA, E. C.; ARAÚJO, J. A.; COSTA, F. G. P.; TEIXEIRA, E. N. M. Farelo de trigo e complexo enzimático na alimentação de poedeiras semipesadas na fase de produção. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, n. 5, p. 843-848, 2008.

BOLÍVAR, J.M.; MATEO, C.; ROCHA, MARTIN, J.;CAVA, F.; BERENGUER, J.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. GUIBAN, J.M. Stabilization of a glutamate de hydrogenase from *Thermus thermophilus* by immobilization on heterofunctional supports. **Enzymeand Microbial Technology**., v. 44, p.139-144, 2009.

BRAGA, A. R. C.; **Obtenção e caracterização da enzima β -galactosidase submetida a diferentes processos: purificação, imobilização e altas pressões.** 135 f. Tese (Doutorado), Departamento Bioprocessos em Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2012.

CANTONE, I.; FISHER, A. G. Epigenetic programming and reprogramming during development. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 20, p. 282-289, 2013.

CARDOSO, C. L.; MORAES, M. C.; CASS, Q. B. Imobilização de enzimas em suportes cromatográficos: uma ferramenta na busca por substâncias bioativas, **Química Nova**, v. 32, p. 175-187, 2007

CARVALHO, N. B.; LIMA, A. S.; SOARES, C. M. F. Uso de sílicas modificadas para imobilização de lipases, **Química Nova**, v. 38, p. 399-409, 2015.

CAVICCHIOLI, R.; SIDDIQUI, K.S.; ANDREWS, D.; SOWERS, K.R. Low-temperature extremophiles and their applications. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, n. 3, p. 253-261, 2002.

CHIBATA, I. **Immobilization of enzymes- research and development**, New York: Kodonsha, 1978, 284 p.

CORTEZ, D. V.; CASTRO, H. F.; ANDRADE, G. S. S. Potencial catalítico de lipases ligadas ao micélio de fungos filamentosos em processos de biotransformação, **Química Nova**, v. 40, p. 85-96, 2017.

COWAN, D.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Enhancing the functional properties of thermophilic enzymes by chemical modification and immobilization. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 49, p. 326-346, 2011.

DAABROWSKY, S.; SOBIEWSKA, G.; MACIUŃSKA, J.; SYNOWIECKI, J.; KUR, J. Cloning, expression and purification of the His 6-tagged thermostable β -galactosidase from *Pyrococcus woesei* in *Escherichia coli* and some properties of the isolated enzyme. **Protein Expression and Purification**, v. 19, n. 1, p. 107-112, 2000.

DALLA-VECCHIA, R., SEBRÃO, D.; NASCIMENTO, M. G.; SOLDI, V. Synthetic applications of immobilized lipases in polymers. **Química Nova**, v. 27, p. 623-630, 2004.

DARIF, A. P. S. **Estudo da imobilização de β -galactosidase de *Aspergillus oryzae*, *Kluyveromyces lactis* e *Saccharomyces marxianus var lactis* em matriz de alginato de cálcio, gelatina e transglutaminase**. 110 f. Dissertação (Mestrado),

Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2018.

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

FACIN, B. R.; MORET, B.; BARETTA, D.; BELFIORE, L. A.; PAULINO, A. T. Immobilization and controlled release of β -galactosidase from chitosan-grafted hydrogels, **Food Chemistry**, v. 179, p. 44-51, 2015.

FALLEIROS, L. N. S. S.; CABRAL, B. V.; FISCHER, J.; GUIDINI, C. Z.; CARDOSO, V. L.; RESENDE, M. M.; RIBEIRO, E. J. Improvement of recovered activity and stability of the *Aspergillus oryzae* β -galactosidase immobilized on duolite A568 by combination of immobilization methods, **Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly**, v. 23, p. 495-506, 2017.

FERNÁNDEZ-LAFUENTE, F.; ROSELL, C. M.; GUISÁN, J. M. The use of stabilized penicillin acylase derivatives improves the design of kinetically controlled synthesis. **Journal of Molecular Catalysis Chemical**, v. 101, p. 91-97, 1995.

FICANHA, A. M.; NYARI, N. L.; LEVANDOSKI, K.; MIGNONI, M. L.; DALLAGO, R. M. Estudo da imobilização de lipase em sílica obtida pela técnica sol-gel, **Química Nova**, v. 38, p. 364-369, 2015.

FREITAS, F. F.; MARQUEZ, L. D. S.; RIBEIRO, G. P.; BRANDÃO, G. C.; CARDOSO, V. L.; RIBEIRO, E. J. Optimization of the immobilization process of β -galactosidase by combined entrapment-cross-linking and the kinetics of lactose hydrolysis. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v.29, nº01, p. 12-24, 2012.

GALVÃO, C. M. A. **Hidrólise controlada de proteínas do soro láctico usando tripsina e quimotripsina imobilizadas em diferentes suportes**. 191 f. Tese (Doutorado)- Curso de Programa de Pós-graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2004.

GARCIA-GALAN, C.; BERENGUER-MURCIA, A.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; RODRIGUES, R. C. Potential of Different Enzyme Immobilization Strategies to

Improve Enzyme Performance. **Advanced Synthesis e Catalysis**, v. 353, n. 16, p. 2885-2904, 2011.

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

GONAWAN, F. N. Simultaneous adsorption and fixation of *Aspergillus oryzae* β -galactosidase on polyelectrolyte-layered polysulfone hollow-fiber membrane, **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 55, p. 21-29, 2015.

GONAWAN, F. N.; KAMARUDDIN, A. H.; ABU BAKAR, M. Z.; KARIM, K. A. Simultaneous Adsorption and Fixation of *Aspergillus oryzae* β -galactosidase on Polyelectrolyte-Layered Polysulfone Hollow-Fiber Membrane. **Industrial & Engineering Chemistry. Research**, p. 21-29, 2016.

GUERRERO, C.; VERA, C.; SERNA, N.; ILLANES, A. Immobilization of *Aspergillus oryzae* β -galactosidase in an agarose matrix functionalized by four different methods and application to the synthesis of lactulose. **Bioresouce Techonology**, v. 232, p. 53-63, 2017.

GUIDINI, C. Z.; FISCHER, J.; SANTANA, L. N. S.; CARDOSO, V. L.; RIBEIRO, E. J.; Immobilization of *Aspergillus oryzae* β -galactosidase in ion exchange resins by combined ionic-binding method and cross-linking, **Biochemical Engineering Journal**, v. 52, p. 137-143, 2010.

GUISAN, J. M. **Immobilization of Enzymes and Cells**; Guisan J. M., ed.; Humana Press: Totowa, cap. 1, 2006.

HONGCAI, Z.; YU, H.; MEI, J.; ZHANG, Y.; DENG, Z. Preparation, characterization and in vitro release of β -galactosidase loaded polyelectrolyte nanoparticles. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 115, p. 1-9, 2018.

HUSAIN, Q. β -galactosidases and their potential applications: A review. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 30, p. 41-62, 2010.

ILLANES, A .;RUIZ, A.; ZUÑIGA, M. E. Análisis comparativo de las lactasas microbianas en gas inmovilizadas. **Alimentos**, v.18, p. 26-34, 1993.

ILLANES, A. Stability of biocatalysts. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 2, 1999.

KLEIN, M. P. **Imobilização de β -galactosidase para obtenção de produtos lácteos com baixo teor de lactose**. Tese (Doutorado), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

KRIZNIK, L.; VASIC, K.; KENZ, Z.; LEITEGEB, M. Hyper-activation of β -galactosidase from *Aspergillus oryzae* via immobilization onto amino-silane and chitosan magnetic maghemite nanoparticles, **Journal of Cleaner Production**, v. 179, p. 225-234, 2018.

LADERO, M.; SANTOS, A.; GARCÍA, J.L.; CARRASCOSA, A.V.; PESSELA, B.C.; GARCÍA-OCHOA, F. Studies on the activity and the stability of β -galactosidases from *Thermus* strain T2 and from *Kluyveromyces fragilis*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 30, n. 3, p. 392-405, 2002.

LEMOES, G. P. M. **Imobilização de enzimas em membranas para a hidrólise de lactose**. 34f. Trabalho de Conclusão de Curso, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2018.

LIAO, X.; ZHENG, Q.-W.; ZHOU, Q.; LIN, J. F.; GUO, L. Q.; YUN, F. Characterization of recombinant β -galactosidase and its use in enzymatic synthesis of lactulose from lactose and fructose. **Journal of Molecular Catalysis Biotechnology Enzymatic**, v. 134, p. 253-260, 2016.

LIMA, M. A. C. DE; ALVES, R. E.; FILGUEIRAS, H. A. Mudanças relacionadas ao amaciamento da graviola durante a maturação pós-colheita, **Embrapa**, v. 41, p. 1707-1713, 2006.

LÓPEZ ZALLEGRO, F.; F.; MONTES, T; FUENTES, M.; ALONSO, N.; GRAZU, V.; BETANCOR, L; GUISÁN, J.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Improved stabilization of chemically aminated enzymes via multipoint covalent attachment on glyoxyl supports. **Journal Biotechnology**, v. 116, p. 1-10, 2005.

MANRICH, A.; GALVÃO, C. M. A; JESUS C.D.F.; GIORDANO, R.C; GIORDANO R. L. C; Immobilization of trypsin on chitosan gels: Use of different activation protocols and comparison with other supports. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 43, p. 54-61, 2008.

MATEO, C.; PALOMO, J. M.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; GUISÁN, J. M.; FERNÁNDEZ LAFUENTE, R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme and Microbial Technology**,v. 40, p.1451-1463, 2007.

MATTAR, R.; MAZO, D. F. C. Intolerância à lactose: mudança de paradigmas com a biologia molecular. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v. 56, p. 230-236, 2010.

MATTHEWS, B. W. The structure of *E. coli* β -galactosidase. **Comptes Rendus Biologies**, v. 328, p. 549-556, 2005.

MENDES, A. A.; DE CASTRO, H. F.; RODRIGUES, D. S.; ADRIANO, W. S.; TARDIOLI, P. W.; MAMMARELLA, E. J.; GIORDANO, R. C.; GIORDANO, R. L. C., Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial. **Química Nova**, v. 34, p. 831-840, 2011.

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

OLIVEIRA, C.; GUIMARÃES, P. M. R.; DOMINGUES, L. Recombinant microbial systems for improved β - galactosidase production and biotechnological applications. **Biotechnology Advances**, v.29, p. 600-609, 2011.

PAGAN, M.; SUAZO, D.; DEL TORO, N.; GRIEBENOW, K.A comparative study of different protein immobilization methods for the construction of efficient nano-structured lactate oxidase-SWCNT-biosensor. **Biosensors and Bioeletronics**, v. 64, p. 138-146, 2015.

PANESAR, P. S.; KUMARI, S.; PANESAR, R. Potential Applications of immobilized β -galactosidase in food processing industries. **Enzyme Research Laboratory**, p.1-16, 2010.

PARK, A. R.; OH, D. K. Galacto-oligosaccharide production using microbial β -galactosidase: current state and perspectives. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 85, n. 5, p. 1279-1286, 2010.

PAVEL, I. A., PRAZERES, S. F.; MONTALVO, G.; RUIZ, C. G.; NICOLAS, V.; CELZARD, A.; DEHEZ, F.; CANABADY-ROCHELLE, L.; CANILHO, N.; PASC, A. Effect of mesoporous macro size of hierarchical porous silica on the adsorption and activity of immobilized β -galactosidase, **Langmuir**, v. 33, p. 3333-3340, 2017.

PESSELA, B. C. C.; MATEO, C.; FUENTES, M.; VIAN, A.; GARCIA, J. L.; CARRASCOSA, A. V.; GUISAN, J. M.; LAFUENTE, F.R. The immobilization of a thermophilic β -galactosidase on Sepabeads supports decreases product inhibition - Complete hydrolysis of lactose in dairy products. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 33, p.199-205, 2003.

PRADELLA, G. C. Aplicação de enzimas na Tecnologia de Alimentos, In: AQUARONE, E.; BORZANI, W. SCHIMIDELL, W; LIMA, U. A. **Biotecnologia Industrial**. São Paulo, Edgard Blucher Ltda, v. 4, p 387-418, 2001.

PRAZERES, S. F.; ZAPATA, F.; CANILHO, N.; PASC, A.; GARCIA-RUIZ, C.; MONTALVO, G. Probing the confinement of β -galactosidase in meso-macro porous silica by Raman spectroscopy, **Microporous and mesoporous Materials**, v. 278, p. 149-155, 2019.

RAFAEL, R. S; **Imobilização de β -galactosidase através de ligações covalentes multipontuais em suporte contendo grupamentos epoxi**, 71f. Dissertação (Mestrado), Centro Universitário UNIVATES, Lajeado, 2014.

RIBEIRO, L. M. O.; FALLEIROS, L. N. S. S.; RESENDE, M. M.; RIBEIRO, E. J.; ALMEIDA, R. M. R. G.; SILVA, A. O. S. Immobilization of the enzyme invertase in SBA-15 with surfaces functionalized by different organic compounds. **Journal of Porous Materials**, v. 26, p. 77-89, 2019.

SANTOS, R. R. **Caracterização e aplicação de borras do refino de óleos vegetais para produção de lipase fúngica por fermentação no estado sólido**. 97f. Dissertação (Mestrado), Departamento de Instituto de Tecnologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2012.

SCHIMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BOZARNI, W; **Biotechnologia Industrial**, Edgar Blucher Ltda, v. 2, p.356, 2001.

SHARMA, S. K., LEBLANC, R. M. Biosensors based on β -galactosidase enzyme: Recent advances and perspectives, **Analytical Biochemistry**, v. 535, p. 1-11, 2017.

SILVÉRIO, S. C.; MACEDO, E. A.; TEIXEIRA, J. A.; RODRIGUES, L. R. New β -galactosidase producers with potential for prebiotic synthesis, **Bioresource Technology**, v. 250, p. 131-139, 2017.

SOUZA, L. T. A.; VERÍSSIMO, L. A. A.; PESSELA, B. C., Imobilização enzimática: princípios fundamentais e tipos de suporte, **Biotechnologia Aplicada à Agro&Indústria**, v. 4, ed. Blucher, 2017.

TANRISEVEN, A.; DOGAN, S.A novel method for the immobilization of β -galactosidase. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 27-30, 2002.

TOMAKOV, AA; SATO, KL. Activity and intracellular localization of senescence-associated β -galactosidase in aging *Xenopus* oocytes and eggs. **Experimental Gerontology**, v. 119, p. 157-167, 2019.

URRUTIA, P; BERNAL, C; WILSON, L.; ILLANES, A. Improvement of chitosan derivatization for the immobilization of *Bacillus circulans* β -galactosidase and its further application in galacto-oligosaccharide synthesis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 41, p. 10126-10135, 2014.

WANG, D.; CHEN, J.; NUGEN, S. R. Electrochemical Detection of *Escherichia coli* from Aqueous Samples Using Engineered Phages. **Analytical Chemistry**, v. 89, p. 1650-1657, 2017.

XIANGZHU CHEN, XUEYAN ZHANG, XIAODONG MA, YUANYUAN ZHANG, GUI GAO, JINGJING LIU, SHICONG HOU. Novel fluorescent probe for rapid and

radiometric detection of β -galactosidase and live cell imaging. **Talanta**, v. 192, p. 308-313, 2019.

YANG, S.T.; MARCHIO, J. L.; YEN, J. W. A dynamic light scattering study of β -galactosidase: Environmental effects on protein conformation and enzyme activity. **Biotechnology Progress**, v. 10, p. 525-531, 1994.