



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA



**IMOBILIZAÇÃO DE β -GALACTOSIDASE COMERCIAL E
PRODUZIDA POR *K. marxianus* EM SÍLICA E AVALIAÇÃO
DA SÍNTESE ENZIMÁTICA DE GALACTO-
OLIGOSSACARÍDEOS**

Carla Cristina de Sousa

UBERLÂNDIA-MG

2022



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA



**IMOBILIZAÇÃO DE β -GALACTOSIDASE COMERCIAL E
PRODUZIDA POR *K. marxianus* EM SÍLICA E AVALIAÇÃO
DA SÍNTESE ENZIMÁTICA DE GALACTO-
OLIGOSSACARÍDEOS**

Carla Cristina de Sousa

Orientadores: Miriam Maria de Resende

Eloízio Júlio Ribeiro

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Engenharia Química, área de concentração em Pesquisa e Desenvolvimento de Processos Químicos.

UBERLÂNDIA-MG
2022

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

S725 2022	Sousa, Carla Cristina de, 1993- IMOBILIZAÇÃO DE -GALACTOSIDASE COMERCIAL E PRODUZIDA POR K. marxianus EM SÍLICA E AVALIAÇÃO DA SÍNTESE ENZIMÁTICA DE GALACTO-OLIGOSSACARÍDEOS [recurso eletrônico] / Carla Cristina de Sousa. - 2022. Orientadora: Miriam Maria de Resende. Coorientadora: Eloízio Júlio Ribeiro . Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-graduação em Engenharia Química. Modo de acesso: Internet. Disponível em: http://doi.org/10.14393/ufu.te.2022.134 Inclui bibliografia. 1. Engenharia química. I. Resende, Miriam Maria de, 1971-, (Orient.). II. , Eloízio Júlio Ribeiro, 1951-, (Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Engenharia Química. IV. Título. CDU: 66.0
--------------	---

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:

Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química
Av. João Naves de Ávila, 2121, Bloco 1K, Sala 206 - Bairro Santa Mônica, Uberlândia-MG, CEP 38400-902
Telefone: (34)3239-4249 - www.ppgeq.feq.ufu.br - secpgeq@feq.ufu.br



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Engenharia Química				
Defesa de:	Tese de Doutorado, 02/2022, PPGEQ				
Data:	24 de fevereiro de 2022	Hora de início:	08:00	Hora de encerramento:	10:50
Matrícula do Discente:	11813EQU004				
Nome do Discente:	Carla Cristina de Sousa				
Título do Trabalho:	Imobilização de β -galactosidase comercial e produzida por <i>K. marxianus</i> em sílica e avaliação da síntese enzimática de galacto-oligossacarídeos				
Área de concentração:	Desenvolvimento de Processos Químicos				
Linha de pesquisa:	Engenharia Bioquímica				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Coleta e seleção de cepas e estudo da produção, purificação e utilização de enzimas e bioprodutos em processos industriais				

Reuniu-se por meio de webconferência, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, assim composta: Professores Doutores: Carolina Merheb Dini - ICTE/UFTM; Janaína Fischer - ICEG/UPF; Fabiana Regina Xavier Batista - PPGEQ/UFU; Larissa Nayhara Soares Santana Falleiros - PPGEQ/UFU; Eloízio Júlio Ribeiro - FEQUI/UFU, coorientador e Miriam Maria de Resende - PPGEQ/UFU, orientadora da candidata.

Iniciando os trabalhos a presidente da mesa, Profa. Dra. Miriam Maria de Resende, apresentou a Comissão Examinadora e a candidata, agradeceu a presença do público, e concedeu à Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação da Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

Aprovada.

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Fabiana Regina Xavier Batista, Professor(a) do Magistério Superior**, em 24/02/2022, às 10:43, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Miriam Maria de Resende, Professor(a) do Magistério Superior**, em 24/02/2022, às 10:44, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Larissa Nayhara Soares Santana Falleiros, Professor(a) do Magistério Superior**, em 24/02/2022, às 10:44, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Janaína Fischer, Usuário Externo**, em 24/02/2022, às 10:45, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Eloizio Julio Ribeiro, Professor(a) do Magistério Superior**, em 24/02/2022, às 10:45, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Carolina Merheb Dini, Usuário Externo**, em 24/02/2022, às 14:16, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **3399024** e o código CRC **4FD879CA**.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus, que é o meu sustento, meu guia, minha força e minha luz, sem Ele nada sou, a caminhada jamais seria concluída. Obrigada por me conceder saúde e força para superar todos os obstáculos!

Agradeço aos meus pais, Gislene e Carlos, por não mediram esforços para a realização do meu sonho, acreditaram no meu potencial e sempre me apoiaram em todas as decisões, por todos os ensinamentos, amor, carinho e companheirismo, muito obrigada!

Aos meus amados avós João e Petronília, joias raras da minha vida, agradeço todo amor, zelo e incentivo. Vocês são grandes exemplos de vida!

Ao Júnior meu amor, agradeço por todo amor, dedicação, cuidado e companheirismo durante essa etapa.

Agradeço a cada um da minha família, que sempre me apoiam e me incentivam a ser melhor. Em especial meu irmão Rafael, minha tia/madrinha Gislaine, as minhas primas Aline e Camila, meu Tio Roberto e minha sogra Deusdete por toda ajuda e motivação durante minha caminhada.

Em especial meus agradecimentos aos meus orientadores Miriam e Eloízio, muito obrigada pelos ensinamentos e pela oportunidade de realização desse trabalho. Agradeço em especial a Miriam, que esteve ao meu lado durante toda minha caminhada, sempre me trazendo uma solução e nunca me deixou desistir.

Agradeço à professora Larissa que sempre colaborou para uma boa execução do meu trabalho, uma grande amiga de trabalho e também de fé.

Agradeço os técnicos e professores da FEQUI, por toda ajuda e paciência.

Agradeço também as minhas amigas que sempre estiveram comigo deixando os dias mais leves Alice, Amanda, Ana, Flávia, Marina, Nara, Nathiele e Stelinha.

Agradeço aos meus amigos do Ministério Universidades Renovadas em especial aos meus companheiros do GOU Santa Mônica, quantas vezes vocês me acolheram e me ajudaram a confiar e esperar no nosso DEUS. Muito Obrigada! Agradeço ao meu psicólogo José Lucas que executou muito bem o seu trabalho e me ajudou a controlar toda ansiedade durante essa jornada.

De forma especial meus agradecimentos aos meus amigos e colegas do NUCBIO, por todas as experiências compartilhadas, toda ajuda e diversão!

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Uberlândia, agradeço pela oportunidade concedida.

À CAPES pelo o apoio financeiro concedido.

À banca examinadora, por terem aceitado o convite e por ajudarem a engrandecer o meu trabalho.

Enfim, agradeço a todos que me apoiaram e participaram para que a realização deste trabalho fosse possível. *Minha eterna e sincera gratidão!*

*Dedico este trabalho primeiramente a Deus, aos meus pais Gislene e Carlos, meus avós
Petronília e João, tia Gislaine, Aline, Camila e ao meu noivo Júnior.*

*“Sê firme e corajoso. Não te atemorizes, não
tenhas medo, porque o Senhor está contigo
em qualquer parte para onde fores.”*
Josué 1,9.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	iv
LISTA DE SÍMBOLOS	vi
RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO	9
1.1 OBJETIVOS	11
1.1.1 Objetivos específicos	11
CAPÍTULO 2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	12
2.1 LACTOSE	12
2.1.1 Soro de leite.....	14
2.1.2 Permeado de soro de leite.....	14
2.2 β -GALACTOSIDASE	16
2.2.1 Mecanismos das reações da β -galactosidase	17
2.2.2 Fontes de obtenção da β -galactosidase.....	18
2.2.3 Fatores que influenciam a atividade da β -galactosidase	20
2.3 ESTRATÉGIAS DE PURIFICAÇÃO DE ENZIMAS	21
2.4 IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS	22
2.5 MÉTODOS DE IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS	25
2.5.1 Imobilização por ligação a suportes	26
2.5.2 Imobilização por retenção física.....	29
2.5.3 Imobilização por ligação cruzada.....	30
2.5.4 Suportes para imobilização	31
2.6 GALACTO-OLIGOSSACARÍDEOS (GOS)	34
2.6.1 Efeitos no organismo.....	35
2.6.2 Síntese dos galacto-oligossacarídeos.....	36

CAPÍTULO 3 - MATERIAL E MÉTODOS.....	41
3.1 MATERIAL	42
3.1.1 Enzimas	42
3.1.2 Suporte para imobilização	43
3.1.3 Substratos	44
3.1.4 Unidade Experimental	46
3.2 METODOLOGIA.....	51
3.2.1 Determinação da atividade enzimática.....	51
3.2.2 Produção da β -galactosidade de <i>K. marxianus</i>	52
3.2.3 Determinação das concentrações de açúcares	53
3.3 IMOBILIZAÇÃO DA β -GALACTOSIDASE EM SÍLICA.....	53
3.3.1 Preparação da sílica	53
3.3.2 Atividade recuperada na imobilização da β -galactosidase.....	54
3.4 TESTES PRELIMINARES DE IMOBILIZAÇÃO DA ENZIMA COMERCIAL LACTOZYME® 2600 L	54
3.4.1 Avaliação do tempo de imobilização da β -galactosidase	55
3.5 AVALIAÇÃO DAS MELHORES CONDIÇÕES DE IMOBILIZAÇÃO DA β - GALACTOSIDASE COMERCIAL EM SÍLICA DE POROSIDADE CONTROLADA	55
3.6 REAVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE APTES NA IMOBILIZAÇÃO DA β - GALACTOSIDASE COMERCIAL EM SÍLICA DE POROSIDADE CONTROLADA	57
3.7 CARACTERIZAÇÃO DA β -GALACTOSIDASE COMERCIAL IMOBILIZADA EM SÍLICA	58
3.7.1 Influência do pH e da temperatura na atividade da enzima imobilizada...	58
3.7.2 Estabilidade ao pH da enzima imobilizada	58
3.7.3 Estabilidade térmica da enzima imobilizada	58
3.7.4 Parâmetros termodinâmicos relativos à ativação e desativação térmica...	60
3.7.5 Reutilização da enzima imobilizada.....	60
3.7.6 Estabilidade ao armazenamento da enzima imobilizada.....	61

3.7.7 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) .	61
3.7.8 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	61
3.8 HIDRÓLISE DA LACTOSE EM LEITO FIXO	61
3.9 AVALIAÇÃO DA IMOBILIZAÇÃO DE β -GALACTOSIDASE PRODUZIDA POR FERMENTAÇÃO COM <i>Kluyveromyces marxianus</i>	62
3.9.1 Imobilização do extrato enzimático bruto em sílica.....	63
3.10 AVALIAÇÃO DA PURIFICAÇÃO PARCIAL DA β -GALACTOSIDASE PRODUZIDA POR <i>Kluyveromyces marxianus</i>	63
3.10.1 Avaliação da ligação do extrato bruto enzimático em Duolite A-568 em leito fixo como estratégia de purificação parcial	64
3.10.2 Diálise do extrato bruto enzimático.....	64
3.10.3 Precipitação com sal seguida de diálise	65
3.10.4 Utilização das resinas AMBERLITE XAD761 [®] e AMBERJET [™] 4200 CI como estratégias de purificação parcial do extrato bruto enzimático.....	65
3.10.5 Avaliação da Toyopearl [®] DEAE-650s como estratégia de purificação parcial do extrato enzimático bruto	66
3.11 SÍNTESE DOS GALACTO-OLIGOSSACARÍDEOS	66
3.11.1 Testes preliminares	67
3.12 INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE LACTOSE, AGITAÇÃO E TEMPERATURA NA PRODUÇÃO DE GALACTO-OLIGOSSACARÍDEOS COM β -GALACTOSIDASE COMERCIAL IMOBILIZADA EM SÍLICA	68
3.13 SÍNTESE DE GALACTO-OLIGOSSACARÍDEOS COM A ENZIMA COMERCIAL UTILIZANDO AGITAÇÃO MAGNÉTICA E MECÂNICA	69
3.13.1 Agitação magnética na síntese de galacto-oligossacarídeos	69
3.13.2 Agitação mecânica na síntese de galacto-oligossacarídeos.....	70
3.14 SÍNTESE DE GALACTO-OLIGOSSACARÍDEOS EM REATOR TIPO LEITO FIXO UTILIZANDO A β -GALACTOSIDASE COMERCIAL IMOBILIZADA EM SÍLICA	70
3.14.1 Leito fixo empacotado com β -galactosidase comercial imobilizada em sílica associada com esferas de vidro na síntese dos galacto-oligossacarídeos.....	71

3.15 SÍNTESE DE GALACTO-OLIGOSSACARÍDEOS COM A β -GALACTOSIDASE PRODUZIDA POR <i>K. marxianus</i> NA SUA FORMA LIVRE E IMOBILIZADA EM SÍLICA	72
3.15.1 Enzima produzida por <i>K. marxianus</i> na forma livre	72
3.15.2 Enzima produzida por <i>K. marxianus</i> imobilizada em sílica de porosidade controlada	73
CAPÍTULO 4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	74
4.1 IMOBILIZAÇÃO DA β -GALACTOSIDASE COMERCIAL EM SÍLICA	74
4.1.1 Avaliação do tempo de imobilização da β -galactosidase	75
4.2 AVALIAÇÃO DAS MELHORES CONDIÇÕES DE IMOBILIZAÇÃO DA β -GALACTOSIDASE COMERCIAL EM SÍLICA DE POROSIDADE CONTROLADA	76
4.3 REAVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE APTES NA IMOBILIZAÇÃO DA β -GALACTOSIDASE COMERCIAL EM SÍLICA DE POROSIDADE CONTROLADA	85
4.4 CARACTERIZAÇÃO DA β -GALACTOSIDASE COMERCIAL IMOBILIZADA EM SÍLICA	86
4.4.1 Influência do pH e temperatura na atividade da enzima imobilizada	86
4.4.2 Estabilidade ao pH da enzima imobilizada	88
4.4.3 Estabilidade térmica da enzima imobilizada	89
4.4.4 Parâmetros termodinâmicos relativos à ativação e desativação térmica ...	97
4.4.5 Reutilização da enzima imobilizada	98
4.4.6 Estabilidade ao armazenamento da enzima imobilizada	99
4.4.7 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR)	100
4.4.8 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	102
4.5 HIDRÓLISE DA LACTOSE EM LEITO FIXO	103
4.6 AVALIAÇÃO DA IMOBILIZAÇÃO DE β -GALACTOSIDASE PRODUZIDA POR <i>Kluyveromyces marxianus</i>	104
4.6.1 Imobilização do extrato enzimático bruto obtido por <i>K. marxianus</i> em sílica	104

4.7 AVALIAÇÃO DA PURIFICAÇÃO PARCIAL DA β -GALACTOSIDASE PRODUZIDA POR <i>Kluyveromyces marxianus</i>	106
4.7.1 Avaliação da ligação do extrato bruto enzimático em Duolite A-568 em leito fixo como estratégia de purificação parcial	106
4.7.2 Diálise do extrato bruto enzimático.....	107
4.7.3 Precipitação com sal seguida de diálise	108
4.7.4 Utilização das resinas AMBERLITE XAD761 [®] e AMBERJET [™] 4200 CI como estratégias de purificação parcial do extrato bruto enzimático.....	110
4.7.5 Avaliação da Toyopearl [®] DEAE-650s como estratégia de purificação parcial do extrato enzimático bruto	111
4.8 SÍNTESE DOS GALACTO-OLIGOSSACARÍDEOS	112
4.8.1 Síntese dos galacto-oligossacarídeos com a enzima comercial (Lactozyme [®] 2600 L) livre e imobilizada	112
4.8.2 Influência da força iônica do tampão na síntese dos galacto-oligossacarídeos com a enzima comercial (Lactozyme [®] 2600 L) imobilizada em sílica	115
4.9 INFLUÊNCIA DA LACTOSE, AGITAÇÃO E TEMPERATURA NA PRODUÇÃO DE GALACTO-OLIGOSSACARÍDEOS COM β -GALACTOSIDASE COMERCIAL IMOBILIZADA EM SÍLICA.....	116
4.10 SÍNTESE DE GALACTO-OLIGOSSACARÍDEOS COM A ENZIMA COMERCIAL UTILIZANDO AGITAÇÃO MAGNÉTICA E MECÂNICA	119
4.10.1 Agitação magnética na síntese de galacto-oligossacarídeos	119
4.10.2 Agitação mecânica na síntese de galacto-oligossacarídeos.....	121
4.11 SÍNTESE DE GALACTO-OLIGOSSACARÍDEOS EM REATOR TIPO LEITO FIXO UTILIZANDO A β -GALACTOSIDASE COMERCIAL IMOBILIZADA EM SÍLICA	122
4.11.1 Leito fixo empacotado com β -galactosidase comercial imobilizada em sílica associada com esferas de vidro na síntese dos galacto-oligossacarídeos.....	124
4.12 SÍNTESE DE GALACTO-OLIGOSSACARÍDEOS COM A β -GALACTOSIDASE PRODUZIDA POR <i>K. marxianus</i> NA SUA FORMA LIVRE E IMOBILIZADA EM SÍLICA	125
CAPÍTULO 5 - CONCLUSÕES	128

CAPÍTULO 6 - SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	131
CAPÍTULO 7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	132
ANEXO.....	149
APÊNDICE	151

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 - Mecanismos de ação da β -galactosidase.....	17
Figura 2.2 - Fatores que afetam a imobilização.....	23
Figura 2.3 - Métodos de imobilização de enzimas	26
Figura 2.4 - Mecanismo de reação cross-linking com glutaraldeído.....	30
Figura 2.5 - Funcionalização da sílica com APTES, posterior ativação com glutaraldeído e imobilização da enzima	33
Figura 2.6 - Mecanismo da reação de transgalactosilação da β -galactosidase.....	37
Figura 3.1 - Fluxograma de desenvolvimento da metodologia experimental: Imobilização da enzima β -galactosidase em sílica.....	41
Figura 3.2 - Fluxograma de desenvolvimento da metodologia experimental: Síntese dos galacto-oligossacarídeos	42
Figura 3.3 - Sílica de porosidade controlada	43
Figura 3.4 - Unidade Experimental para determinação da atividade enzimática para enzima solúvel.....	46
Figura 3.5 - Unidade Experimental para determinação da atividade da enzima imobilizada ..	47
Figura 3.6 - Fermentador do tipo Biostat® B utilizado na produção da β -galactosidase.....	48
Figura 3.7 - Processador Ultrassônico utilizado na extração da β -galactosidase	48
Figura 3.8 - Unidade experimental para hidrólise da lactose em leito fixo.....	49
Figura 3.9 - Unidade experimental para síntese de GOS com agitação mecânica	50
Figura 3.10 - Unidade experimental para síntese de GOS em coluna de leito fixo, coluna 1..	50
Figura 3.11 - Unidade experimental para síntese de GOS em coluna de leito fixo, coluna 2..	51
Figura 3.12 - Esquema da unidade da hidrólise da lactose em reator de leito fixo. 1) Solução de alimentação; 2) Bomba peristáltica; 3) Reator com a enzima imobilizada; 4) Produto. ...	62
Figura 3.13 - Esquema da unidade de síntese de GOS em reator de leito fixo 1) Solução de alimentação; 2) Agitador magnético; 3) Bomba peristáltica; 4) Coluna empacotada com biocatalisador imobilizado; 5) Produto; 6) Incubadora com temperatura controlada	71
Figura 3.14 - Esquema da unidade de síntese de GOS em reator de leito fixo 1) Solução de alimentação; 2) Agitador magnético; 3) Bomba peristáltica; 4) Coluna empacotada com biocatalisador imobilizado e esferas de vidro; 5) Produto; 6) Banho termostático; 7) Recheio da coluna sílica (em cinza) e esferas de vidro (em branco)	72
Figura 4.1 - Avaliação de diferentes tempos de imobilização da β -galactosidase comercial em sílica.....	75

Figura 4.2 - Superfícies de respostas e curvas de contorno para influência das três variáveis na resposta de atividade da enzima imobilizada.....	80
Figura 4.3 - Superfícies de respostas e curvas de contorno para influência das três variáveis na resposta de atividade recuperada	81
Figura 4.4 - Superfícies de respostas e curvas de contorno para influência das três variáveis na resposta de eficiência da imobilização.....	82
Figura 4.5 - Análise de desejabilidade da avaliação simultânea das respostas de atividade inicial da enzima ofertada e eficiência de imobilização com influência das três variáveis (X_1 , X_2 e X_3) analisadas	83
Figura 4.6 - Influência de diferentes valores de pH na atividade enzimática da β -galactosidase (Lactozyme® 2600 L) imobilizada em sílica	86
Figura 4.7 - Influência da temperatura na atividade enzimática da β -galactosidase (Lactozyme® 2600 L) imobilizada em sílica	87
Figura 4.8 - Influência de diferentes pH na estabilidade da β -galactosidase (Lactozyme® 2600 L) imobilizada em sílica	88
Figura 4.9 - Perfis de inativação térmica da β -galactosidase (Lactozyme® 2600 L) imobilizada em sílica	89
Figura 4.10 - Perfil de inativação térmica a 20 °C da β -galactosidase (Lactozyme® 2600 L) imobilizada em sílica. Ajuste de modelo matemático aos resultados experimentais: (—) Equação 3.7. Modelo de desativação térmica de primeira ordem; (---) Equação 3.8. Modelo desativação térmica com um estágio.....	92
Figura 4.11 - Perfil de inativação térmica a 30 °C da β -galactosidase (Lactozyme® 2600 L) imobilizada em sílica. Ajuste de modelo matemático aos resultados experimentais: (—) Equação 3.7. Modelo de desativação térmica de primeira ordem; (---) Equação 3.8. Modelo desativação térmica com um estágio.....	93
Figura 4.12 - Perfil de inativação térmica a 40 °C da β -galactosidase (Lactozyme® 2600 L) imobilizada em sílica. Ajuste de modelo matemático aos resultados experimentais: (—) Equação 3.7. Modelo de desativação térmica de primeira ordem; (---) Equação 3.8. Modelo desativação térmica com um estágio.....	94
Figura 4.13 - Perfil de inativação térmica a 45 °C da β -galactosidase (Lactozyme® 2600 L) imobilizada em sílica. Ajuste de modelo matemático a os resultados experimentais: (—) Equação 3.7. Modelo de desativação térmica de primeira ordem; (---) Equação 3.8. Modelo desativação térmica com um estágio.....	95
Figura 4.14 - Modelo obtido por Arrhenius (—) como os resultados experimentais (k_d).....	96

Figura 4.15 - Avaliação da reutilização da β -galactosidase (Lactozyme® 2600 L) imobilizada em sílica	98
Figura 4.16 - Estabilidade ao armazenamento da β -galactosidase (Lactozyme® 2600 L) imobilizada em sílica, mantida sob refrigeração (8 °C).....	99
Figura 4.17 - Espectroscopia de infravermelho com transformadas de Fourier (FT-IR) a) Lactozyme® 2600 L; b) Sílica; c) Sílica com APTES; d) Sílica com APTES e glutaraldeído; e) β -galactosidase (Lactozyme® 2600 L) imobilizada em sílica.....	101
Figura 4.18 - Imagens do MEV (a) sílica pura - 200 μ m, 50 X; (b) sílica com APTES 0,6% e glutaraldeído 6,86% - 1 μ m, 20.00 K X; (c) sílica com APTES 0,6% e glutaraldeído 6,86% - 100 μ m, 400 X; (d) β -galactosidase imobilizada em sílica funcionalizada e ativada - 100 μ m, 400 X, (e) e (f) β -galactosidase imobilizada em sílica funcionalizada e ativada - 1 μ m, 20.00 K X.....	102
Figura 4.19 - Conversão da lactose em reator de leito fixo empacotado com β -galactosidase (Lactozyme® 2600 L) imobilizada em sílica	103
Figura 4.20 - Imobilização em três etapas seriadas da β -galactosidase produzida por <i>K. marxianus</i>	105
Figura 4.21 - Concentração de lactose, GOS, galactose e glicose produzidos com a Lactozyme® 2600 L solúvel (A) Lactose (200 g.L ⁻¹); (B) Lactose (400 g.L ⁻¹)	112
Figura 4.22 - Concentração de lactose, GOS, galactose e glicose produzidos com a Lactozyme® 2600 L imobilizada em sílica (A) Lactose (200 g.L ⁻¹); (B) Lactose (300 g.L ⁻¹)	113
Figura 4.23 - Rendimento na síntese dos GOS (A) Rendimentos com Lactozyme® 2600 L livre; (B) Rendimentos com Lactozyme® 2600 L imobilizada em sílica.....	114
Figura 4.24 - Estimativas dos efeitos para concentração de lactose, agitação e temperatura na concentração dos GOS para o Planejamento Fatorial Fracionário 2 ⁴⁻¹	118
Figura 4.25 - Concentração e rendimento de GOS na síntese por agitação magnética em reator de mistura. Concentração de lactose 400 g.L ⁻¹ a 40 °C e 200 rpm.	120
Figura 4.26 - Concentrações de lactose, galactose, glicose e GOS utilizando reator tipo leito fixo com alimentação de solução de lactose 400 g.L ⁻¹ , a 40 °C, vazão de 0,1 mL.min ⁻¹	123
Figura 4.27 - Concentrações de lactose, galactose, glicose e GOS utilizando reator tipo leito fixo com sílica e esferas de vidro. Alimentação de solução de lactose a 400 g.L ⁻¹ , a 40 °C, vazão de 0,1 mL.min ⁻¹	125
Figura 4.28 - Concentração de GOS e rendimento de GOS na síntese por agitação magnética em reator de mistura com β -galactosidase livre produzida por <i>K. marxianus</i> . Nas condições de concentração de lactose 400 g.L ⁻¹ a 40 °C e 400 rpm.....	126

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 - Diferentes aplicações para lactose.....	13
Tabela 2.2 - Principais vantagens e desvantagens dos processos de imobilização de enzimas.....	24
Tabela 2.3 - Estruturas dos GOS formados a partir da transgalactosilação com β -galactosidase	39
Tabela 2.4 - Diferentes condições para síntese enzimática dos GOS.....	39
Tabela 3.1 - Composição do Meio de Manutenção YMA.....	43
Tabela 3.2 - Composição do Tampão Lático.....	44
Tabela 3.3 - Composição do meio inóculo para cultivo da <i>K. marxianus</i>	45
Tabela 3.4 - Composição do meio de cultura para fermentação da <i>K. marxianus</i>	45
Tabela 3.5 - Valores reais e codificados utilizados no Planejamento Composto Central	56
Tabela 3.6 - Matriz do PCC com os valores codificados e originais das variáveis.....	57
Tabela 3.7 - Valores reais e codificados avaliados no Planejamento Fatorial Fracionário	68
Tabela 3.8 - Matriz do Planejamento Fatorial Fracionário com os valores originais e codificados das variáveis.....	69
Tabela 4.1 - Avaliação da imobilização em sílica funcionalizada em fase aquosa e orgânica	74
Tabela 4.2 - Matriz com os resultados obtidos da imobilização de β -galactosidase (Lactozyme® 2600 L) em sílica	77
Tabela 4.3 - ANOVA para resposta da atividade da enzima imobilizada em sílica.....	79
Tabela 4.4 - ANOVA para resposta da atividade recuperada da enzima imobilizada em sílica	79
Tabela 4.5 - ANOVA para resposta da eficiência da enzima imobilizada em sílica.....	79
Tabela 4.6 - Avaliação da concentração de APTES 0,6 e 1,0% na imobilização da β -galactosidase comercial em sílica	85
Tabela 4.7 - Ajuste dos dados experimentais aos modelos de desativação térmica de primeira ordem e em um estágio para β -galactosidase comercial imobilizada.....	91
Tabela 4.8 - Constantes de desativação térmica (k_d) e tempos de meia-vida para cada temperatura, obtidos pelo modelo de desativação térmica de primeira ordem.....	96
Tabela 4.9 - Parâmetros termodinâmicos estimados para β -galactosidase imobilizada em sílica	97
Tabela 4.10 - Avaliação da imobilização de β -galactosidase produzida por <i>K. marxianus</i> dialisada e liofilizada em sílica	107

Tabela 4.11 - Avaliação da imobilização de β -galactosidase produzida por <i>K. marxianus</i> precipitada com sulfato de amônio, dialisada e liofilizada	109
Tabela 4.12 - Influência da força iônica do tampão fosfato de potássio (pH 7,0) na concentração de galacto-oligossacarídeos, a 30 °C e concentração de lactose a 300 g.L ⁻¹	116
Tabela 4.13 - Valores reais e os valores codificados (entre parênteses) e resultados experimentais obtido pelo Planejamento Fatorial Fracionário 2 ⁴⁻¹ ensaios acrescidos de 3 pontos centrais para a síntese de GOS em tampão fosfato de potássio 0,05 M, pH 7,0 ..	117
Tabela 4.14 - Concentração de GOS e rendimento de GOS na síntese por agitação mecânica a 400 e 600 rpm nas condições de concentração de lactose 400 g.L ⁻¹ a 40 °C	121

LISTA DE SÍMBOLOS

β	Beta - forma anomérica da enzima β -galactosidase
T	Temperatura absoluta (K)
A	Atividade enzimática
A_0	Atividade enzimática inicial
A/A_0	Atividade enzimática em relação à inicial
$\alpha_1 = E_1/E$	Razão entre a atividade específica do estado final (E_1) para uma modelagem de inativação com uma única etapa e a atividade inicial (E)
k_d	Constante cinética de desativação térmica
$t_{1/2}$	Tempo de meia-vida
A^*	Fator de frequência para a reação
E_a	Energia de ativação do processo de desativação térmica da enzima
R^2	Coeficiente de correlação
t	t de student
p	Nível de significância
$\sum(V-V_{\text{mod}})^2$	Somatória dos quadrados dos desvios das observações (V) em relação ao modelo (V_{mod})
U	Atividade enzimática (μmol de glicose por minuto)
AR	Atividade Recuperada (%)
E	Eficiência de imobilização (%)

RESUMO

A enzima β -galactosidase é amplamente aplicada na indústria, ela realiza a hidrólise da lactose e também a transgalactosilação, produzindo os galacto-oligossacarídeos (GOS), que possuem efeitos prebióticos no organismo humano. O uso da β -galactosidase pode apresentar limitações devido às suas características, como restrição em temperaturas, pHs, impossibilidade de reutilização dentre outros. A *Kluyveromyces lactis* e a *Kluyveromyces marxianus* são leveduras potenciais na produção de β -galactosidase e interferem nas suas características. Com intuito de contornar essas limitações nos processos, são utilizados métodos de imobilização de enzimas. A ligação covalente é um desses processos, ela promove resistência às enzimas imobilizadas em diferentes condições e reduz perdas por lixiviação. A sílica é um suporte muito utilizado, pois promove boa ligação da enzima ao suporte. Assim, o objetivo do trabalho foi avaliar a imobilização de β -galactosidase comercial de *K. lactis* e β -galactosidase produzida por *K. marxianus* em sílica de porosidade controlada e posteriormente realizar a síntese dos galacto-oligossacarídeos. Uma avaliação das melhores condições de imobilização da β -galactosidase comercial foi feita com um Planejamento Composto Central (PCC). O biocatalisador imobilizado foi avaliado em relação a influência do pH e temperatura na atividade da enzima, estabilidade térmica, ao pH e armazenamento, reutilização, espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) e microscopia eletrônica de varredura (MEV). A hidrólise da lactose com a enzima imobilizada foi avaliada também em leito fixo. A β -galactosidase produzida por fermentação submersa da *K. marxianus* foi avaliada quanto à imobilização em sílica e em relação algumas técnicas parciais de purificação. A síntese dos galacto-oligossacarídeos foi feita com a enzima comercial e produzida em sua forma livre e imobilizada. A força iônica do tampão foi avaliada na transgalactosilação e um Planejamento Fatorial Fracionário também foi proposto avaliando a interferência da concentração inicial de lactose, agitação e temperatura na síntese de GOS. A agitação magnética, mecânica e a configuração de reator tipo leito fixo também foram avaliadas na síntese dos GOS. As melhores condições de imobilização foram em concentração de γ -aminopropiltriethoxysilano (APTES) a 1,0%, atividade inicial da enzima ofertada em 21 U.mL⁻¹ e concentração de glutaraldeído a 6,86%. O biocatalisador imobilizado apresentou pH ótimo em 7,0, temperatura em 30 °C e estabilidade em pH 7,5. A estabilidade térmica foi melhor em temperatura mais amena (20 °C). Em 4 ciclos de reuso a enzima manteve $\approx 70\%$ da atividade inicial. A enzima armazenada (8 °C) conservou sua atividade em 44% após 105 dias. O FT-IR permitiu a visualização de grupos da enzima e da ligação enzima-suporte. As imagens obtidas da MEV evidenciaram a estrutura da sílica. Com o leito fixo obteve-se uma conversão de lactose de $\approx 47\%$. A imobilização da β -galactosidase produzida com *K. marxianus* foi limitada e dentre as técnicas de purificação parcial se destacou o processo de diálise. Os GOS foram produzidos em altas concentrações de lactose (400 g.L⁻¹), sendo em menor tempo (3 h) para enzima livre e maior para imobilizada (6 h). Os efeitos das variáveis avaliadas no Planejamento Fatorial Fracionário foram positivos, a influência mais efetiva foi da agitação, a maior concentração de GOS foi de 67,70 g.L⁻¹. Tanto em agitação magnética como mecânica foi possível sintetizar os GOS com a enzima imobilizada, as concentrações de GOS foram de 70,81 e 90,37 g.L⁻¹, respectivamente. Em leito fixo as maiores concentrações de GOS foram obtidas para coluna empacotada com sílica imobilizada alcançando valor de 100,18 g.L⁻¹. A enzima produzida por *K. marxianus* sintetizou GOS em sua forma livre (106,97 g.L⁻¹). A β -galactosidase imobilizada em sílica é promissora tanto na hidrólise da lactose como na síntese de GOS.

Palavras-chave: β -galactosidase; sílica; ligação covalente; transgalactosilação; galacto-oligossacarídeos.

ABSTRACT

The β -galactosidase enzyme is widely applied in industry. It performs lactose hydrolysis and also transgalactosylation, producing galactooligosaccharides (GOS), which have prebiotic effects in the human body. The use of β -galactosidase may present limitations due to its characteristics, such as restriction in temperatures, pHs, and impossibility of reuse, among others. *Kluyveromyces lactis* and *Kluyveromyces marxianus* are potential yeasts for obtaining β -galactosidase and interfering in its characteristics. In order to circumvent these limitations in the processes, enzyme immobilization methods are used. Covalent bonding is one of these processes, it promotes resistance of immobilized enzymes under different conditions and reduces leaching losses. Silica is a widely used support, as it promotes good enzyme binding to the support. Therefore, the aim of the current work was to evaluate the immobilization of commercial β -galactosidase from *K. lactis* and β -galactosidase produced by *K. marxianus* in silica with controlled porosity and subsequently carry out the synthesis of galactooligosaccharides. An evaluation of the best immobilization conditions for commercial β -galactosidase was performed with a Central Composite Design (CCD). The immobilized biocatalyst was characterized in relation to the influence of pH and temperature on enzyme activity, thermal stability, pH and storage, reuse, Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR), and scanning electron microscopy (SEM). The hydrolysis of lactose with the immobilized enzyme was also evaluated in a fixed bed. The β -galactosidase produced by submerged fermentation of *K. marxianus* was evaluated for immobilization on silica and for some partial purification techniques. The synthesis of galactooligosaccharides was performed with the commercial enzyme and produced in its free and immobilized form. The ionic strength of the buffer was evaluated in the transgalactosylation and a Fractional Factorial Design was also proposed to evaluate the interference of the initial lactose concentration, agitation, and temperature in the synthesis of GOS. Magnetic and mechanical stirring and the fixed bed reactor configuration were also evaluated in the synthesis of GOS. The best immobilization conditions were at 1,0% γ -aminopropyltriethoxysilane (APTES) concentration, initial enzyme activity offered at 21 U.mL⁻¹, and 6,86% glutaraldehyde concentration. The immobilized biocatalyst showed optimal pH at 7.0, the temperature at 30 °C, and stability at pH 7.5. Thermal stability was better at a milder temperature of 20 °C. In 4 cycles of reuse, the enzyme maintained $\approx$ 70% of the initial activity and stored (8 °C) maintained its activity in 44% after 105 days. The FT-IR allowed visualization of enzyme groups and supported enzyme binding. The images obtained from SEM showed the structure of the silica. With the fixed bed, a lactose conversion of $\approx$ 47% was obtained. The immobilization of the β -galactosidase produced with *K. marxianus* was limited and among the partial purification techniques the dialysis process stood out. The GOS were produced in high concentrations of lactose (400 g.L⁻¹), with a shorter time (3 h) for free enzyme and longer for immobilized enzyme (6 h). The effects of the variables evaluated in the Fractional Factorial Design were positive, the most effective influence was agitation, the highest concentration of GOS was 67.70 g.L⁻¹. Both in magnetic and mechanical agitation it was possible to synthesize the GOS with the immobilized enzyme, the GOS concentrations were 70.81 and 90.37 g.L⁻¹, respectively. In a fixed bed, the highest GOS concentrations were obtained for the column packed with immobilized silica, reaching a value of 100.18 g.L⁻¹. The enzyme produced by *K. marxianus* synthesized GOS in its free form (106.97 g.L⁻¹). Silica immobilized β -galactosidase shows promise in both lactose hydrolysis and GOS synthesis.

Keywords: β -galactosidase; silica; covalent bonding; transgalactosylation; galactooligosaccharides.

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

A enzima β -galactosidase é uma importante carboidrase que catalisa a reação de hidrólise da lactose e também a transgalactosilação, que produz os galacto-oligossacarídeos (GOS) (GEKAS; LOPEZ-LEIVA, 1987). Ela tem ampla aplicação biotecnológica, estando envolvida em vários processos na indústria. É bastante difundida na elaboração de produtos isentos de lactose, cada vez mais comercializados no mundo, além disso podem melhorar características sensoriais nos produtos, como doçura, solubilidade e sabor. Podem sintetizar oligossacarídeos, utilizando fontes baratas como por exemplo soro de leite. Esse resíduo apresenta alto potencial poluidor e é gerado em altas quantidades, assim a reutilização desse soro de leite e do permeado de soro de leite como substratos para produção de microrganismos e GOS se torna uma boa alternativa em relação aos custos e em termos de conservação ambiental (VERA et al., 2020; ALBUQUERQUE et al., 2021).

Esta enzima pode ser obtida de diferentes fontes, sendo a via microbiana a mais utilizada. Dentre os microrganismos, as leveduras *Kluyveromyces lactis* e *Kluyveromyces marxianus* se destacam, pois apresentam características interessantes como rápido crescimento, assimilam lactose e ainda possuem caráter GRAS (*Generally Recognized As Safe*), sendo reconhecidas como microrganismos seguros (LANE; MORRISSEY, 2010; BRASIL, 2014; ALBUQUERQUE et al., 2021). Vários estudos já avaliaram o grande potencial dessas leveduras, segundo Padilla et al. (2015) as β -galactosidases de *K. lactis* e *K. marxianus* podem ser utilizadas com eficiência na produção de oligossacarídeos e na produção de lactulose obtida por isomerização.

A vasta aplicação de enzimas nos processos, como a β -galactosidase, levou ao desenvolvimento de técnicas para ampliar sua utilização, destacando-se as estratégias de imobilização. A imobilização enzimática traz grandes vantagens, como o aumento da estabilidade em relação ao pH, temperatura e armazenamento, possibilita a reutilização da enzima, facilita o processo de *downstream*, possibilita utilização em processos contínuos e proporciona maior controle do processo catalítico (SHELDON; VAN PELT, 2013).

Os métodos de imobilização podem ser por adsorção, ligação iônica, ligação covalente, por aprisionamento e ligação cruzada. A ligação covalente é um método bem difundido, consiste em uma forte ligação covalente entre a enzima e a matriz do suporte, promove

resistência das enzimas imobilizadas para condições físicas e químicas extremas e reduz perdas da enzima por lixiviação (SIRISHA; JAIN; JAIN, 2016).

Os suportes para imobilização podem ser de diferentes tipos, sejam eles naturais ou sintéticos. A sílica é um material que pode ser utilizado como suporte para imobilização, permite modificação química da sua superfície levando a diferentes abordagens para ligação covalente de uma enzima, além disso apresenta boa resistência química, física e mecânica. (SNOCH et al., 2019). Muitos métodos e suportes já são aplicados para as β -galactosidases, contudo o desenvolvimento de novas metodologias é sempre interessante. A imobilização em sílica pode ser mais uma dessas técnicas para aprimorar a aplicação da β -galactosidase.

A hidrólise da lactose foi por muito tempo a maior aplicação da β -galactosidase, porém, nos últimos anos ela vem se destacando na produção enzimática dos GOS. Que ocorre por meio da transgalactosilação, na presença de um meio rico em lactose, no qual há transferência do grupo hidroxila da galactose para a lactose formando assim os GOS. O crescente interesse da população por uma alimentação mais saudável impulsiona ainda mais esse estudo, com o intuito de desenvolver técnicas que possam contribuir para elaboração de alimentos funcionais (PANESAR et al., 2018; VERA et al., 2020).

Os GOS trazem benefícios ao ser humano principalmente na saúde intestinal. Diversos estudos relataram os efeitos promissores no crescimento de atividade de enzimas digestivas, na microbiota intestinal, sistema imunológico, morfologia intestinal e resistência a doenças (TOMAL et al., 2010; HOSEINIFAR; HOSEINI; BAGHERI, 2017; NEDAEI et al., 2019).

A síntese dos GOS está relacionada com as fontes enzimáticas, que interfere nas características da enzima como faixas ótimas de pH e temperatura. Diversos autores também constatarem a influência da concentração de lactose no meio, a temperatura, o tempo de reação e a presença de íons (GOSLING et al., 2010; PANESAR et al., 2018). Vários fatores devem ser considerados para uma produção satisfatória. Logo, é imprescindível o estudo das diferentes condições para as β -galactosidases obtidas de fontes diversas nas suas formas livres e imobilizadas para produção de GOS.

Nesse contexto, o trabalho tem o objetivo de desenvolver uma estratégia de imobilização para a β -galactosidase comercial de *K. lactis* e para a β -galactosidase produzida por *K. marxianus*, utilizando sílica como suporte. E posteriormente avaliar a hidrólise da lactose e sintetizar os GOS. O desenvolvimento dessa nova estratégia pode contribuir para ampliação da produção dos GOS, uma vez, que baixas conversões são mencionadas na literatura (<40,00%). A produção de β -galactosidase de *K. marxianus* foi possível empregando permeado de soro de

leite como substrato, resultando assim numa forma de cultivo de baixo custo para obtenção da enzima. Assim, ainda há uma contribuição ecológica, na valorização e aproveitamento do soro de leite, que é gerado em altíssimas quantidades na indústria de laticínios. Desse modo, um método eficiente de imobilização com um suporte referência como é a sílica, tende a agregar valor na produção dos GOS e também na hidrólise da lactose. Esse estudo, se satisfatório, pode ajudar a aumentar o impacto da utilização da β -galactosidase e também no avanço da síntese de GOS.

1.1 OBJETIVOS

Com base na importância do tema exposto anteriormente, o presente trabalho apresenta como objetivo geral sintetizar galacto-oligossacarídeos empregando β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* e *Kluyveromyces marxianus* imobilizada em sílica de porosidade controlada.

1.1.1 Objetivos específicos

Como objetivos específicos, têm-se:

- ✓ Estudar o processo de imobilização da enzima comercial β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* em sílica mesoporosa.
- ✓ Estudar o processo de imobilização da enzima produzida de β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* em sílica mesoporosa.
- ✓ Avaliar algumas estratégias de purificação da enzima produzida de β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus*.
- ✓ Otimizar a síntese dos galacto-oligossacarídeos com β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis*, definindo as condições de temperatura, agitação, concentração de lactose e força iônica do tampão.
- ✓ Síntese de galacto-oligossacarídeos com β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis*, utilizando agitação magnética e mecânica.
- ✓ Síntese de galacto-oligossacarídeos com β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis*, utilizando leito fixo.
- ✓ Síntese de galacto-oligossacarídeos com a β -galactosidase produzida por *Kluyveromyces marxianus*.

CAPÍTULO 2

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 LACTOSE

A lactose é um dissacarídeo formado por um resíduo de glicose e um de galactose através de uma ligação glicosídica β -1,4. É um açúcar redutor, tendo o carbono anomérico livre para reações com agentes oxidantes. Apresenta-se em forma de um pó branco, cristalino, solúvel em água e insolúvel em álcool e éter, tem baixa solubilidade (21,6 g.100 mL⁻¹ de água) e baixo poder adoçante, quando comparada a sacarose. É bastante aplicada nos processos industriais, principalmente farmacêutica e de alimentos (PORTNOY; BARBANO, 2021).

A lactose possui dois anômeros, α -lactose e β -lactose, que são diferenciados pela orientação do grupo hidroxila (OH) que é ligado ao carbono anomérico da molécula. Os anômeros se diferenciam quando a luz que passa pela solução de lactose, altera a rotação óptica da luz polarizada. O anômero α apresenta maior rotação na direção dextro. A polarimetria dá a medida das rotações, para lactose a rotação específica de α -lactose pura é 89,4 ° e para β -lactose é 35,0 °. Em solução as moléculas de lactose podem passar por mutarrotação que depende da temperatura, ocorrendo a troca entre os dois anômeros α e β -lactose (PORTNOY; BARBANO, 2021).

Na indústria de alimentos há um grande foco na lactose, pois a única fonte natural desse carboidrato é o leite dos mamíferos que possuem placenta, sendo conhecida como açúcar do leite, ela é o principal carboidrato desse alimento. A lactose está disponível em diferentes concentrações em cada tipo de leite: leite materno humano (7,0 mg/100mL), leite de vaca (4,7-5,0 mg/100mL), leite de cabra (4,2-4,8 mg/100mL), leite de búfala (4,8-5,0 mg/100mL), leite de ovelha (4,4-4,8mg/100mL) e ausente para leites vegetais (CATANZARO; SCIUTO; MAROTTA, 2021).

Constitui uma fonte de carbono para os microrganismos, principalmente leveduras que crescem no leite, com o objetivo de produzir lácteos fermentados, biomassa, etanol, enzimas e ácidos orgânicos. Nos sistemas lácteos a lactose pode existir em várias formas, cristalinas e não cristalinas. A qualidade de certos alimentos e a estabilidade de armazenamento é afetada pelo estado físico da lactose (CHANDRAPALA; WIJAYASINGHE; VASILJEVIC, 2016).

Devido às suas características físico-químicas a aplicação da lactose é bastante ampla, podendo ser usada em produtos de confeitarias e padarias, como xarope e preparação de

condimentos, na indústria farmacêutica, sendo em pó e concentrada, produtos assados, promovendo a reação de Maillard, dando coloração desejada. Sendo assim, nos últimos anos diversos estudos foram realizados mostrando, o grande potencial da lactose e suas aplicações nos processos (Tabela 2.1).

Tabela 2.1 - Diferentes aplicações para lactose

Produto	Atuação da lactose	Processo	Referência
Ácido Lactobiônico	Açúcar fermentescível	Oxidação da lactose	Giorgi et al., (2018), Oh et al., (2020), Oh; Eom (2021)
Ácido Lático	Açúcar fermentescível	Ação de bactérias lácticas	Turner et al., (2017), Liu et al., (2018)
β -galactosidase	Açúcar fermentescível	Ação de microrganismos	Kamran et al., (2016), Sousa et al., (2021)
Lactulose	Substrato	Isomerização da Lactose	Ramírez et al., (2021), Zhu et al., (2021)
Galacto-oligosacarídeos	Substrato	Transgalactosilação da β -galactosidase	Yañez-Ñeco et al., (2021), Wang et al., (2021), Zerva et al., (2021)
Lactosacarose	Substrato	Bioconversão da lactose	Li et al., (2015)
Etanol	Açúcar fermentescível	Ação de leveduras	You et al. (2017), Sousa; Gonçalves; Falleiros, (2018)

É nítida a importância da lactose, porém existem problemas nutricionais associados ao seu consumo. A intolerância à lactose acontece quando o corpo humano não é capaz de realizar a digestão da mesma, pois não produz ou produz de forma ineficiente a β -galactosidase, enzima responsável por hidrolisar a lactose em glicose e galactose. A não digestão da lactose gera desconfortos no organismo, podendo causar dores abdominais, vômitos, flatulência, inchaço e diarreia (MATTAR; MAZO, 2010).

Uma alternativa para intolerantes à lactose é o desenvolvimento de produtos restritos em lactose, que são produzidos por meio da realização prévia de sua hidrólise. A hidrólise normalmente é realizada utilizando a β -galactosidase. A hidrólise da lactose na indústria além da elaboração dos produtos para intolerantes, diminui a cristalização da lactose em produtos lácteos prevenindo o desenvolvimento de textura arenosa, além de diminuir o custo com sacarose (PANESAR; KUMARI; PANESAR, 2010).

Todas essas possibilidades de utilização da lactose nos processos têm despertado o interesse na busca por fontes alternativas de lactose. Alcançando redução de custos e também o reaproveitamento de resíduos industriais como o soro de leite e o permeado de soro.

2.1.1 Soro de leite

O soro de leite é um desses produtos é um subproduto da indústria de laticínios. Representa a parte líquida remanescente após a coagulação da caseína do leite. Apresenta de 50 a 60% do valor nutricional do leite e é gerado em alta quantidade, em média a cada 10 litros de leite são produzidos cerca de 1 quilograma de queijo e 9 litros de soro. A lactose e as proteínas solúveis do soro são os componentes mais importantes do soro de leite (MOLLEA; MARMO; BOSCO, 2013; GANJU; GOGATE, 2017; TSERMOULA et al., 2021).

A aplicação do soro de leite como fonte de lactose reduz custos e contribui também para agregar um destino para esse soro que é bem problemático na indústria, devido ao seu alto poder poluente, considerando a sua rica composição. Pesquisas recentes demonstram o grande potencial do soro de leite como fonte de lactose, em processos fermentativos, obtenção de enzimas e oligossacarídeos. You et al., (2017) aplicaram soro de leite em pó para produção de β -galactosidase e etanol. Albuquerque et al., (2018) utilizaram β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* imobilizada para obtenção de lactulose aplicando como substrato soro de queijo. Fischer e Kleinschmidt, (2021) produziram galacto-oligossacarídeos com β -galactosidase de *Cryptococcus laurentii* e *Aspergillus oryzae* aplicando diferentes tipos de soro ácido como substrato. Zerva et al., (2021) avaliaram a produção de galacto-oligossacarídeos com *Thermothielavioides terrestres*, usando como substrato soro de leite ácido, resíduo de uma indústria de iogurte grego.

2.1.2 Permeado de soro de leite

Outro subproduto que pode ser utilizado como fonte de lactose é o permeado de soro. É obtido pela ultrafiltração do soro de leite, nesse processo as proteínas do soro não permeiam a membrana de ultrafiltração e constituem o concentrado ou isolado proteico de soro. A parte que permeia a membrana é denominado de permeado, uma solução diluída de lactose, minerais e nitrogênio não proteico (GOLOWCZYC et al., 2013; PRAZERES; CARVALHO; RIVAS, 2012; TSERMOULA et al., 2021).

O permeado de soro tem boa solubilidade e sabor lácteo agradável, podendo ser utilizado como ingrediente em formulações. Possui ótima relação de custo benefício em funcionalidade e sabor aos alimentos. Pela alta presença de lactose, que é de 76 a 85% aproximadamente, em base seca, e por possuir minerais essenciais, podem contribuir para as características do alimento que será aplicado. Pode ser aplicado em diversos produtos, tanto na alimentação humana como animal. De forma geral é utilizado em produtos cárneos, lácteos, panificação, confeitaria, *snacks*, salgadinhos, sorvetes, suplementos alimentares, ração animal, fármacos e outros (DAIRY EXPORT COUNCIL, 2016; HU; DICKSON, 2015).

A lactose é o principal componente do permeado de soro, ela participa do escurecimento dos produtos (Reação de Maillard), possui sabor menos doce que a sacarose, absorve compostos aromáticos voláteis, possui baixa afinidade com a umidade, é um açúcar cristalizável e atrai e absorve pigmentos sintéticos e naturais. Devido as suas características desejáveis, como o alto teor de lactose, o permeado de soro tem sido utilizado como substrato para o crescimento de microrganismos e também para produção dos galacto-oligossacarídeos (DAIRY EXPORT COUNCIL, 2016; GOLOWCZYC et al., 2013).

Da mesma forma que o soro de leite, o permeado de soro também apresenta potencial na degradação do meio ambiente, considerando a sua composição bioquímica que requer transformações biológicas elaboradas para o seu tratamento. Nesse sentido, encontrar possíveis utilizações foi necessário para agregar valor ao produto e amenizar problemas ambientais, além de custos com tratamento de águas residuais. O permeado de soro passou de um de efluente a uma fonte rentável de nutrientes.

Assim, muitos estudos vêm sendo desenvolvidos utilizando o permeado de soro de leite. Jayamuthunagai et al. (2017) produziram permeado de soro de leite e o utilizaram para obtenção de D-tagarose pela hidrólise da lactose. Mano; Paulino; Pastore, (2019) avaliaram a produção de galacto-oligossacarídeos utilizando permeado de soro de leite como substrato. Suwal et al. (2019) utilizaram a microalga *Tetrademus obliquus* para a produção de galacto-oligossacarídeos, tendo como substrato permeado de soro de leite. Passos et al. (2021) produziram um simbiótico com permeado de soro de queijo. O produto era composto por galacto-oligossacarídeo e por *Saccharomyces boulardii*, uma levedura prebiótica.

2.2 β -GALACTOSIDASE

A β -galactosidase, ou lactase, é uma enzima, classificada como uma hidrolase. Ela catalisa o resíduo terminal β -galactopiranosil da lactose, formando galactose e glicose em quantidades equimolares. Também é responsável por realizar a transgalactosilação, reação concorrente com a hidrólise, que produzirá os GOS. Entre as glicosidases as β -Galactosidases são as mais promissoras com atividades hidrolíticas e de transglicosilação (GÉKAS; LOPEZ-LEIVA, 1985; ANSARI; SATAR, 2012; VERA et al., 2020; LU et al., 2020).

A estrutura da β -galactosidase é formada por um tetrâmero de quatro cadeias polipeptídicas idênticas, cada uma possui 1023 aminoácidos que se interligam formando os cinco domínios estruturais bem definidos. Entretanto, somente um domínio exibe função catalítica e seu sítio ativo é composto principalmente por resíduos do terceiro domínio (ALBUQUERQUE et al., 2021).

Essa enzima foi descoberta a muito tempo, sendo mencionada pela primeira vez em 1889. Todavia, sua relevância tecnológica foi impulsionada pela intolerância à lactose de mais de 60% da população. Pessoas intolerantes a lactose, não conseguem digerir esse dissacarídeo tendo uma série de efeitos no organismo, como: diarreia, cólicas, inchaço e náuseas. Desse modo, a indústria teve que se adequar com intuito de oferecer produtos que pudessem ser consumidos por essa parte da população. Desde então sua principal aplicação é no desenvolvimento de produtos restritos em lactose (VERA et al., 2020).

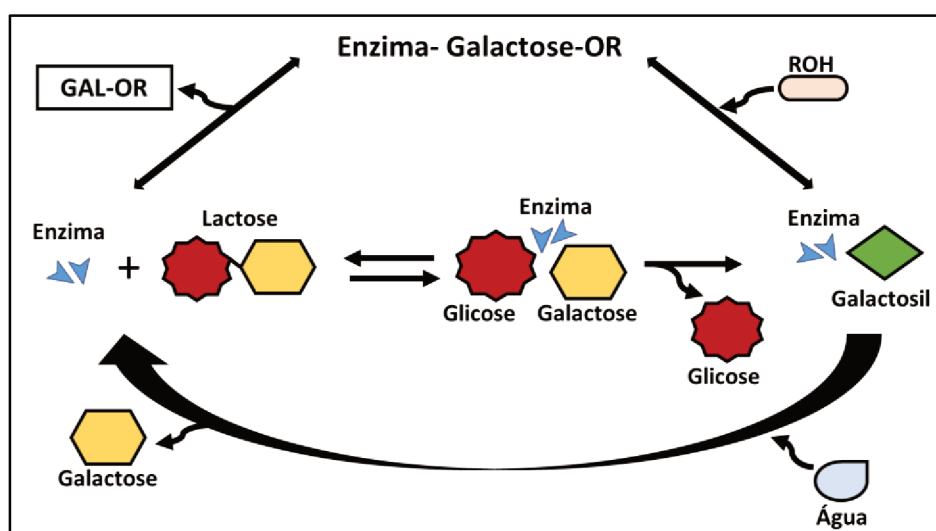
No entanto, sua aplicação não se resume a hidrólise. A β -galactosidase tem se destacado na produção dos galacto-oligossacarídeos (GOS) por meio da transgalactosilação. Essa transgalactosilação pode também gerar outros produtos como a lactulose, frutossil-galacto-oligossacarídeos e alquil-galactosídeos. Esta enzima ainda pode ser utilizada na pesquisa como um gene repórter devido à liberação de grupos cromogênicos ou fluorogênicos detectáveis por hidrólise de substratos de galactósídeos artificiais. É também aplicada como biossensor (LU et al., 2020; VERA et al., 2020; HOSSEINI; MAS, 2021). Como exposto, a β -galactosidase tem uma extensa aplicação biotecnologia. Logo, é importante conhecer os mecanismos de cada reação, produção e fatores que possam influenciar a atividade da mesma.

2.2.1 Mecanismos das reações da β -galactosidase

A β -galactosidase realiza um processo catalítico com mecanismo de duplo deslocamento. A reação de hidrólise da lactose forma inicialmente glicose e galactose. Contudo, a depender das condições, a mistura isomolecular pode não ser alcançada, pois existe uma competição entre a reação de hidrólise e a de transgalactosilação (GÉKAS; LOPEZ-LEIVA, 1985; MAHONEY, 1998; LU et al., 2020).

A Figura 2.1 apresenta o mecanismo das reações da β -galactosidase. Inicialmente a enzima age sobre a lactose, formando o complexo enzima-galactosil e liberando simultaneamente a glicose. Em sequência, o complexo enzima-galactosil é transferido para um acceptor com grupo hidroxil. Em um meio com baixa concentração de lactose, a água é mais competitiva que outros açúcares para ser o acceptor desse complexo, assim a galactose é liberada. Em situações de altas concentrações de lactose, as moléculas de lactose, mono, di e oligossacarídeos são mais prováveis para serem acceptoras do complexo enzima-galactosil, produzindo os galacto-oligossacarídeos (GOS) (MAHONEY, 1998; TORRES et al., 2010; LU et al., 2020).

Figura 2.1 - Mecanismos de ação da β -galactosidase
(ROH: Radical hidroxila; GAL-OR: GOS)



Fonte: Adaptada de MAHONEY, 1998.

Como as reações de hidrólise da lactose e a transgalactosilação são reações competitivas, a depender do produto de interesse, utilizam-se estratégias para induzir uma reação ou outra. As β -galactosidases exibem diferentes seletividades para água e sacarídeos,

pois enzimas oriundas de diferentes fontes produzem quantidades variadas de GOS na mesma concentração de lactose. Os diferentes rendimentos de GOS são explicados devido as diferenças estruturais e/ou mecanísticas entre β -galactosidases de diferentes fontes. Por isso se faz necessário conhecer as diferentes origens dessa enzima.

2.2.2 Fontes de obtenção da β -galactosidase

Amplamente distribuída na natureza, a β -galactosidase pode ser encontrada em plantas, animais e microrganismos, como bactérias, fungos filamentosos e leveduras. A obtenção por via microbiana é a mais difundida. Leveduras e fungos merecem destaque na produção dessa enzima, sendo bastante utilizados (GÉKAS; LOPEZ-LEIVA, 1985; HUSAIN, 2010). Para aplicação na indústria de alimentos a β -galactosidase não pode oferecer riscos à saúde do consumidor, assim, a fonte de obtenção não deve apresentar riscos de toxicidade. No Brasil, existe uma legislação, que esclarece quais são os microrganismos que podem ser utilizados na obtenção dessa enzima. De acordo com a Resolução RDC nº 53 de 07 de Outubro de 2014 os microrganismos *A. niger*, *A. oryzae*, *C. pseudotropicalis*, *K. lactis*, *K. fragilis*, *K. marxianus* e *Saccharomyces sp.* podem ser aplicados. Garantindo segurança alimentar (BRASIL, 2014), sendo eles classificados como *Generally Recognized As Safe* (GRAS) pela *Food and Drug Administration* (FDA).

A fonte de obtenção da β -galactosidase, afeta diretamente as suas propriedades, levando a diferenças nas características químicas e cinéticas. Em um processo industrial, é imprescindível o conhecimento dessas propriedades para que a enzima possa atender adequadamente as necessidades. Logo, a β -galactosidase tem sido explorada em diferentes fontes de obtenção em processos distintos, como pode ser observado pelo Quadro 2.1.

De um modo geral, as β -galactosidases de cada grupo de microrganismos apresentam características similares. As β -galactosidases de leveduras apresentam temperatura ótima na faixa de 30 a 40 °C e o pH ótimo de 6,0 a 7,0. As β -galactosidases de fungos filamentosos possuem pH ótimo na faixa de 2,5 a 4,5 e temperatura de atuação alta. Sendo esta superior a 50 °C e na maioria dos casos produzem a enzima de forma extracelular, facilitando a recuperação. As β -galactosidases de bactérias possuem aplicação limitada, considerando o risco de toxicidade na utilização em alimentos. Assim, é necessário observar o caráter de segurança de cada microrganismo. Em geral, apresentam pH ótimo na região neutra 6,5 a 7,5, quanto a

temperatura, algumas cepas possuem alta estabilidade e atividade em altas temperaturas (>50 °C) (SHUKLA; WIERZBICKI, 1975; SAQIB et al., 2017).

Quadro 2.1 - Diferentes fontes de obtenção da β -galactosidase em aplicações variadas

Tipo Microrganismo	Fonte de obtenção	Aplicação	Referência
Leveduras	<i>Kluyveromyces lactis</i>	Hidrólise da lactose	Campello et al. (2012); Ricardi et al. (2018); Cargnin; Gaspar; Paulino (2020);
		Produção de GOS	Lisboa et al. (2012); Rico-Rodriguez et al. (2020)
	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Hidrólise da lactose	Santiago et al. (2004); Sousa; Gonçalves; Falleiros, 2018; Sousa et al. (2021)
		Produção de GOS	Manera et al. (2010)
	<i>Kluyveromyces (Saccharomyces) fragilis</i>	Hidrólise da lactose	Vieira et al. (2013); Bosso et al. (2019)
Fungos Filamentosos	<i>Aspergillus oryzae</i>	Hidrólise da lactose	Fischer et al. (2013); Falleiros et al. (2017); Shafi; Ahmed; Husain, (2021)
		Produção de GOS	Eskandarloo; Abbaspourrad, (2018); Guerrero et al. (2019);
	<i>Aspergillus aculeatus</i>	Produção de GOS	Nguyen et al. (2018)
Bactérias	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Produção de GOS	Carevic et al. (2018)
	<i>Bacillus circulans</i>	Produção de GOS	Urrutia et al. (2013); Hackenhaar et al. (2021);
		Síntese de lactulose	Yin; Dijkhuizen; Leeuwen (2018); Aburto et al. (2020)
	<i>Bacillus licheniformis</i>	Hidrólise da lactose	Kuribayashi et al. (2021)
	<i>Paracoccus marcusii</i>	Síntese de lactulose	Kalathinathan et al. (2021)

Dentre tantas fontes de obtenção da β -galactosidase, as leveduras merecem um destaque, considerando sua ampla aplicação. As suas características como o pH de atuação na faixa entre 6,0-7,0, facilita a utilização na indústria de laticínios, visto que a faixa de pH ótimo é bem próxima à do leite que é de 6,4 a 6,9. As leveduras *K. marxianus* e *K. lactis* são grandes representantes desse grupo e são imensamente avaliadas em diferentes processos (RICARDI et al., 2018; ALBUQUERQUE et al., 2021; SOUSA et al., 2021). Ambas possuem status GRAS e não oferecem risco de toxicidade ao ser humano. São regulamentadas pela legislação brasileira

podendo ser utilizadas sem nenhum problema. São consideradas espécies irmãs, de acordo com Pereira-Rodriguez et al. (2012) a enzima β -galactosidase de *K. lactis* possui 99% de identidade com a enzima β -galactosidase de *K. marxianus*, podendo então serem comparadas. O gênero *Kluyveromyces* é capaz de assimilar lactose e inulina. Apresentam bom rendimento de crescimento e ampla faixa de temperatura (LANE; MORRISEY, 2010; ZHOU et al., 2013; KARIM; GERLANI; AIDER, 2020).

2.2.3 Fatores que influenciam a atividade da β -galactosidase

A composição do meio reacional e a concentração dos substratos são fatores importantes que podem interferir na atividade da enzima. A hidrólise da lactose por exemplo, pode ser dificultada pela inibição do produto, como a glicose e galactose, tal fato reduz a reação de hidrólise e também a transgalactosilação. Atualmente estratégias estão sendo desenvolvidas, como engenharia de proteínas, modificações genéticas, diferentes possibilidades de ligação enzima-substrato, tudo com intuito de aumentar a atividade catalítica (ALBUQUERQUE et al., 2021).

A temperatura e o pH são fatores que atuam diretamente na atividade enzimática. Como já apresentado, a depender da fonte, cada enzima terá uma faixa ótima de temperatura e pH. A equação de Arrhenius é normalmente utilizada para avaliar os efeitos da temperatura nos parâmetros cinéticos. Em relação ao pH, é relevante mencionar que a principal aplicação da β -galactosidase é na indústria de laticínios, o pH do leite é em torno de 7,0 então normalmente utilizam enzimas que atuem nessa faixa como é o caso da β -galactosidase produzida por *K. lactis* e *K. marxianus* (PEREIRA-RODRIGUES et al., 2012).

Outro fator que também interfere na atividade da β -galactosidase é a presença de íons. A inativação dessa enzima está associada a dissociação das subunidades e ligações iônicas presentes entre as subunidades, causada pela presença de cátions ou ânions multivalentes. Alguns estudos demonstraram que Mn^{2+} e Mg^{2+} foram eficientes para diminuir a desativação térmica, enquanto Zn^{+} e Cu^{+} inativaram completamente a enzima. Algumas β -galactosidas só são totalmente ativas na presença de cátions, como sódio (Na^{+}), potássio (K^{+}), e magnésio (Mg^{+}). A presença desses cátions afeta a estrutura da enzima e eles podem agir ainda como cofatores interferindo na ligação do substrato (ALVANIJEH et al., 2020; ALBUQUERQUE et al., 2021).

2.3 ESTRATÉGIAS DE PURIFICAÇÃO DE ENZIMAS

As enzimas, de forma geral, quando são produzidas necessitam de passar por etapas de purificação para remover os componentes do meio que podem afetar negativamente a atividade da enzima em questão. Com a β -galactosidase não é diferente, ela após ser produzida e extraída deve passar por etapas de purificação. Ao desenvolver uma estratégia de purificação inicialmente se faz necessário saber o grau de pureza requerido. Uma enzima que será aplicada para fins terapêuticos com uso direto por humanos deve apresentar um alto grau de pureza, o que não é tão crítico para uma enzima aplicada em processos industriais, que pode ter um grau de pureza menor (GÜNERKEN et al., 2015).

A pureza será um determinante na atividade, estabilidade, aplicação e valor comercial da enzima. Para uma purificação em larga escala são necessárias de 4 a 6 etapas, que podem ser divididas em dois grupos. O primeiro é composto pelos processos de recuperação da enzima: separação e ruptura de células, separação dos fragmentos e concentração da proteína. No segundo grupo o objetivo é purificar a enzima, aplicando etapas de pré-tratamento ou isolamento primário, purificação de alta resolução e refinamento final. As indústrias seguem realizando pesquisas que possam diminuir o número de etapas na purificação, para facilitar o processo e tentar reduzir os custos (GÜNERKEN et al., 2015).

A produção da β -galactosidase pela levedura *K. marxianus* ocorre de forma intracelular, sendo necessária uma etapa de ruptura das células para sua liberação, etapa crucial nos processos de *downstream*, uma vez que qualquer problema causado ao produto nesta fase inicial, pode comprometer ou invalidar todos os processos subsequentes. A ruptura para recuperação de proteínas intracelulares pode ser feita por diferentes métodos. Eles vão depender da força física da parede celular dos microrganismos, estabilidade, posição dentro da célula e do uso desejado para o composto de interesse. Dentre os métodos pode-se utilizar sonicação, ultrassom, métodos químicos ou enzimáticos, seguidos de centrifugação, o sobrenadante é o extrato bruto enzimático (GÜNERKEN et al., 2015; RIGO et al., 2021).

Para a escolha da técnica a ser aplicada na purificação de enzimas deve-se considerar as propriedades moleculares inerentes a cada proteína. É preciso selecionar uma combinação correta de etapas que explorem estas propriedades para que ocorra a purificação de uma mistura. Nas primeiras etapas é feita a redução do volume, podendo ser feito por precipitação com sais ou solventes orgânicos, ultrafiltração e extração em sistema aquoso bifásico. Em sequência são utilizadas técnicas para separação da molécula alvo, que podem explorar interações

eletrostáticas (resinas de troca iônica; cromatografia de troca iônica). Por fim, o objetivo é aumentar a resolução da molécula em questão, utilizando técnicas como cromatografia em gel e cromatografia de afinidade. Não é recomendado uma estratégia geral que possa ser aplicada em todos os processos, cada caso é diferente devendo considerar as propriedades das moléculas, os materiais disponíveis e aplicação (RIGO et al., 2021).

Como não há um método geral, normalmente vários testes são realizados até encontrar um método que seja realmente efetivo. A eletroforese gel (SDS-PAGE) é utilizada para indicar a pureza e a quantidade de contaminantes. Também pode auxiliar na escolha da cromatográfica em gel para a separação dos contaminantes, pois identifica a massa molecular (HARRIS, 2001).

A alta complexidade das estratégias de purificação impulsionaram diversos estudos da purificação da β -galactosidase proveniente de diferentes fontes. Heidtmann et al. (2012) avaliaram o fracionamento com sulfato de amônio de β -galactosidase de *K. marxianus*. Após a precipitação foi realizada diálise. Com essa estratégia foi alcançado uma recuperação de 83,20% da enzima. Lima et al. (2016) avaliaram a purificação de β -galactosidase de *K. lactis* em cromatografia de modo misto, utilizando resina Capto. Antes da eluição na coluna foi realizada precipitação com sal e diálise. O fator de purificação obtido foi de 1,17. Ao final do processo alcançaram recuperação de 41,0% da concentração total de proteína. Ji; Oey; Agyei, 2019 avaliaram a purificação de β -galactosidase de *Lactobacillus leichmannii* 313. A estratégia de purificação utilizou precipitação com sulfato amônio, ultrafiltração e cromatografia líquida de proteína rápida. A atividade enzimática passou de 417 $\mu\text{mol.hmg}^{-1}$ no extrato bruto para 1877 $\mu\text{mol.hmg}^{-1}$ ao final da etapa da cromatografia. Vidya et al. (2020) purificaram β -galactosidase de *A. terreus* utilizando precipitação com sulfato de amônio, diálise, cromatografia de troca iônica e cromatografia de gel. A estratégia foi eficiente para uma recuperação de 10,78 vezes.

A imobilização de enzimas pode ser uma alternativa para purificação e separação de proteínas, considerando os princípios da afinidade da enzima e suporte. É necessário que isso ocorra sem sacrificar as melhorias enzimáticas. O que seria vantajoso financeiramente e em relação ao tempo de processo (GARCIA-GALAN et al., 2011; BARBOSA et al., 2015).

2.4 IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS

A extensa aplicação das enzimas, devido às suas vantagens como biocatalisadores levou ao estudo de enzimas imobilizadas, pois a utilização de sua forma livre é muitas vezes

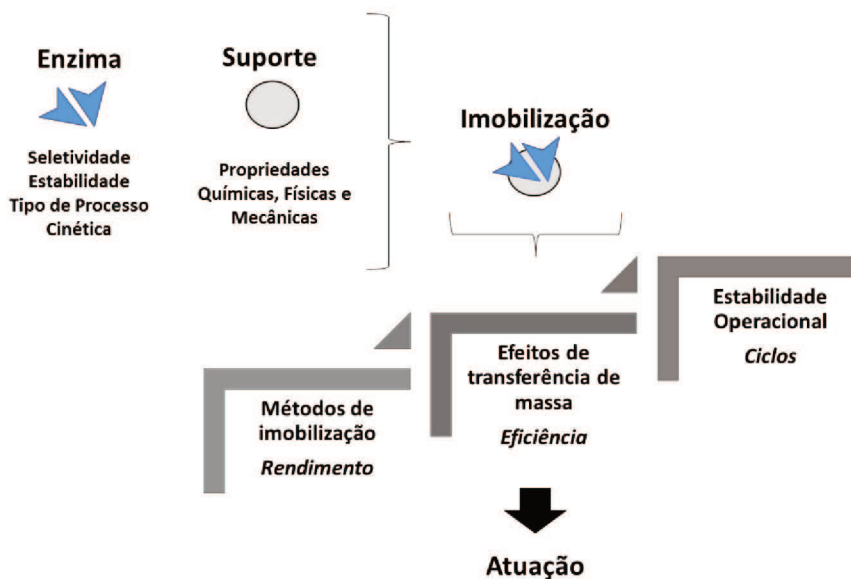
dificultada nos processos, considerando a estabilidade, a dificuldade de recuperação ao fim dos processos e os custos (SHELDON; VAN PELT, 2013). De acordo com Chibata (1978) uma enzima imobilizada é aquela que está fisicamente ou quimicamente ligada em suporte ou matriz com retenção da sua atividade catalítica, podendo ser reutilizada várias vezes.

O processo de imobilização possibilita a reutilização das enzimas e sua aplicação em processos contínuos, além de contribuir na estabilidade operacional e no armazenamento, uma vez que melhora a rigidez da estrutura enzimática. Outras vantagens a serem mencionadas é a não contaminação da enzima ao produto, melhor controle operacional, possibilidade de utilização de maiores quantidades de substratos, uma vez que é possível separar o produto, possibilidade de utilização de alta concentração de enzima em um volume menor de reator e maior controle do processo catalítico (GROSOVÁ; ROSENBERG; REBROS, 2008; SHELDON, VAN PELT, 2013).

A utilização de técnicas de imobilização aumenta os custos dos processos, pois necessita da aquisição de suportes e também pelo custo da enzima, entretanto, os valores podem ser reparados com o processo de reutilização das enzimas (MATEO et al., 2007; SHELDON, VAN PELT, 2013).

A imobilização de enzimas combina a seletividade, estabilidade e cinética da enzima com as propriedades químicas e aspecto físico de um suporte em uma formulação especializada, tendo a maximização da estabilidade física e enzimática do biocatalisador (Figura 2.2).

Figura 2.2 - Fatores que afetam a imobilização



Fonte: Adaptada de BASSO; SERBAN, 2019

Alterações podem ocorrer em enzimas imobilizadas devido a modificações em suas propriedades químicas e físicas. As causas dessas modificações podem ser decorrentes de diferentes efeitos, como (SHELDON, 2007):

- ✓ *Efeitos conformacionais*: alteram a conformação da molécula pela modificação da estrutura terciária do sítio ativo.
- ✓ *Efeitos de partição*: efeito da natureza química do material do suporte, com possibilidade de interações eletrostáticas e hidrofóbicas entre a matriz e moléculas de baixa massa molecular existente na solução, podendo levar a alterações do microambiente.
- ✓ *Efeitos estereoquímicos*: o sítio ativo da enzima fica indisponível devido à imobilização de parte da molécula.
- ✓ *Efeitos difusionais ou transferência de massa*: causados pela resistência de difusão de solução do substrato para os sítios catalíticos e difusão dos produtos.

A partir desses efeitos, a enzima imobilizada pode ter suas características modificadas (propriedades cinéticas, pH, temperatura e estabilidade).

A Tabela 2.2 apresenta um resumo das principais vantagens e desvantagens dos processos de imobilização.

A enzima β -galactosidase tem sido amplamente utilizada em processos de imobilização. O seu potencial biotecnológico tem promovido diferentes técnicas de imobilização e tipos de suportes (FALLEIROS et al. 2017; BENIWAY et al., 2018; RICARDI et al., 2018; SOUZA et al., 2019; TIZCHANG et al., 2020; SOUSA et al., 2021).

Tabela 2.2 - Principais vantagens e desvantagens dos processos de imobilização de enzimas

Vantagens	Desvantagens
Redução na quantidade enzima	Inativação de grupo funcional
Melhor controle das reações	Mudanças negativas na cinética
Ampla faixa de pH e temperatura	Custos de imobilização (suportes)
Maior estabilidade por ligação multipontual	Contaminação pelo suporte
Utilização de múltiplas enzimas em reação cascata	Sujidades do suporte
Reuso	Limitações de transferência de massa
Melhores produtividades comparando com a enzima livre	Maior demanda de espaço no reator
Redução de interferências por fatores variados	

Fonte: FOPASE et al., 2020

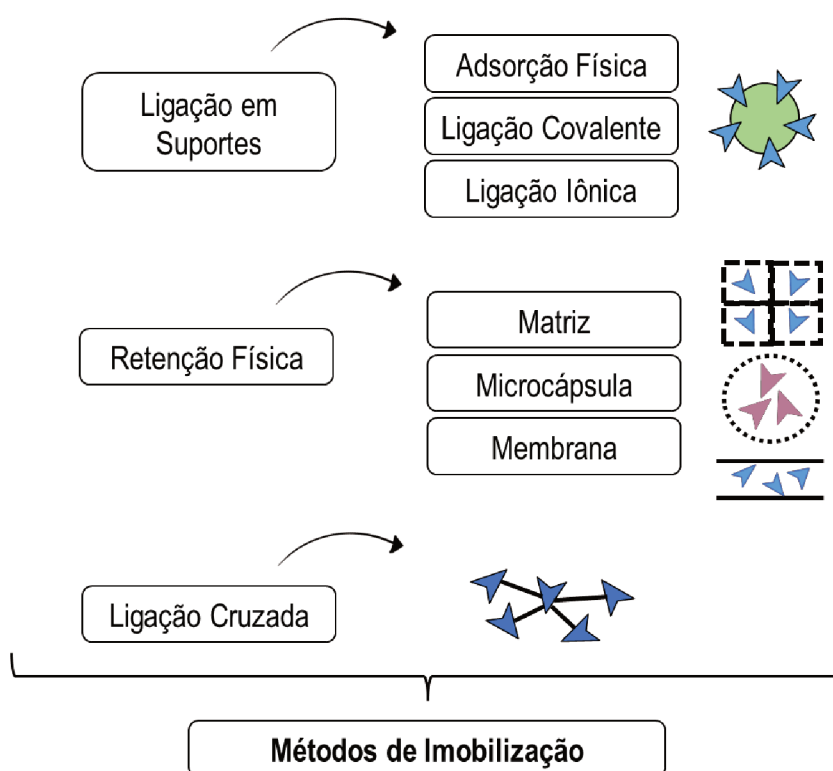
Para aplicação dos processos de imobilização é necessário considerar todos os pontos mencionados. A fim de, que a enzima imobilizada seja eficiente e atenda a demanda do processo em questão, sendo importante a escolha do método de imobilização.

2.5 MÉTODOS DE IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS

Há diversos métodos de imobilização de enzimas, porém não é possível definir um como melhor. Não há um método universal, pois cada enzima apresenta suas características próprias. Todos os métodos apresentam vantagens e desvantagens, que devem ser analisadas para aplicação. Sendo assim, torna-se necessário avaliar alguns pontos, como: simplicidade do método, resistência mecânica da enzima, possibilidade de acoplar imobilização e purificação, efeito do método de imobilização na atividade catalítica da enzima, seletividade e especificidade da enzima, redução de inibição (GARCIA-GALAN et al., 2011).

A imobilização de enzimas em suportes sólidos pode ser de diferentes formas, com base em métodos químicos e físicos. Os métodos de imobilização podem ser por retenção física, no qual a enzima é confinada em uma matriz polimérica, microcápsula ou membrana, ligação da enzima a um material insolúvel ou por utilização de reagente multifuncional por meio de ligação cruzadas (DALLA-VECCHIA et al., 2004). Na Figura 2.3 são apresentados os principais métodos de imobilização e a forma que ocorre a ligação da enzima.

Figura 2.3 - Métodos de imobilização de enzimas



Fonte: Adaptada de DALLA-VECCHIA et al., 2004

2.5.1 Imobilização por ligação a suportes

2.5.1.1 Imobilização por adsorção física

A adsorção física é um método simples, que consiste na ligação da enzima a um suporte por meio de ligações de hidrogênio, forças de Van Der Waals, interações hidrofóbicas e eletrostáticas. Promove pouca perturbação na estrutura nativa da enzima. Dentre os suportes que podem ser utilizados têm-se resinas, carvão ativado, sílica gel, alumina e cerâmica (LIU; CHEN; SHI, 2018).

O processo de adsorção é bem simples, sendo necessário colocar a enzima em contato com o suporte em condições controladas de pH, temperatura, força iônica da solução, tempo de contato, natureza do solvente e quantidade de enzima. Após o tempo de contato determinado é feita a separação por filtração ou centrifugação. O método não necessita de agentes adicionais, nem etapas de modificação (NISHA; ARUM; GOBI, 2012).

A adsorção pode ser reversível, por ter interações fracas entre enzima e suporte. Mas por essas interações serem fracas pode ocorrer a dessorção da enzima e baixa estabilidade, sendo susceptíveis à alterações no pH, temperatura e força iônica. É necessário controlar de forma cuidadosa todos os fatores para que não tenha dessorção (GROSOVÁ; ROSENBERG; REBROS, 2008; LIU; CHEN; SHI, 2018).

Muitos estudos foram realizados utilizando a imobilização por adsorção física com a enzima β -galactosidase. Campello et al. (2012) imobilizaram β -galactosidase de *K. lactis* em Eupergit® C e constatou que a força iônica afetou diretamente o processo de adsorção, considerando o aumento de interações hidrofóbicas. Gurdaz et al. (2012) realizaram a adsorção de β -galactosidase de *A. oryzae* em resina Duolite-A568. Sousa et al. (2021) avaliaram a adsorção de β -galactosidase de *K. marxianus* usando resina Duolite-A568 como suporte, para aplicação na hidrólise da lactose.

2.5.1.2 Imobilização por ligações covalentes

A ligação covalente é um método bem convencional para imobilização de enzimas. Ocorre por reação química entre um grupo nucleofílico da enzima, representado por aminoácidos, podendo ser lisina, cisteína ou resíduos de ácido aspártico e glutâmico, com grupo eletrofílico do suporte previamente ativado (PANESAR; KUMARI; PANESAR, 2010).

A ativação dos grupos funcionais do suporte é feita com reagentes químicos, como glutaraldeído, brometo cianogênio e carbodiimida. O suporte deve ter grupos livres como hidroxila, amida, carboxila ou amina, ou deve ser alterado para ativar os grupos, para que assim ocorra a imobilização. O reagente mais utilizado nos processos é o glutaraldeído. Um grupo aldeído de sua molécula reage com o grupo amino da molécula da enzima e o outro grupo aldeído reage com o grupo amino da matriz do suporte (SIRISHA; JAIN; JAIN, 2016; LIU; CHEN; SHI, 2018).

A ligação enzima e suporte é forte e estável, não tem perda da enzima para a solução, mesmo com substratos ou soluções de força iônica alta, assim o biocatalisador imobilizado irá apresentar alta estabilidade à temperaturas, solventes orgânicos e agentes desnaturantes. Porém, os sítios ativos da enzima podem ser inativados, decorrente das reações químicas entre enzima e suporte, o que acarretará em redução de atividade e especificidade (LIU; CHEN; SHI, 2018).

Esse método de imobilização é bastante difundido e tem como vantagens a fácil interação da enzima com o suporte, desde que ela esteja em sua superfície, e forte resistência

da ligação enzima-suporte, sendo difícil de ser rompida. Contudo, é um processo que demanda altos custos, em certas situações tem baixo rendimento de imobilização, devido a condições de reações extremas, além de não ser possível recuperar o suporte após o processo (SHELDON; VAN PELT, 2013).

Com base nesse método de imobilização, Lima et al. (2013) imobilizaram por ligação covalente β -galactosidase de *K. lactis* em quitosana previamente ativada com glutaraldeído, o processo de imobilização foi responsável por ampliar a faixa de pH e aumentar a estabilidade térmica, operacional e de armazenamento, quando comparado à enzima livre. Nguyen et al. (2019) também ligaram covalentemente a β -galactosidase, só que de *Aspergillus aculeatus*. Utilizaram nanopartículas de quitosana ativadas com glutaraldeído, conseguiram melhor estabilidade térmica da enzima e faixa mais ampla de pH e avaliaram o potencial da enzima imobilizada na produção de GOS.

Para aumentar a estabilidade da enzima imobilizada por ligação covalente, pode-se realizar a ligação covalente multipontual, na qual acontece uma rigidificação da estrutura da enzima e as mudanças conformacionais que geram inativação são reduzidas. Na ligação multipontual tem-se a imobilização e a estabilização da enzima por meio da ligação covalente, formada entre grupo amino da enzima e grupos aldeídos do suporte. Os grupos aldeídos que estão afastados do suporte são ativados previamente, tornando o suporte altamente eletrofílico para ligar aos grupos de aminoácidos da enzima. A ativação provoca ligeiro distanciamento dos grupos aldeídos que permitem a formação das ligações multipontuais, tendo bases de Schiff entre enzima e suporte, ligações adicionais menos estáveis, mas que aumentam a estabilidade do derivado obtido (MATEO et al., 2007).

De acordo com Mateo et al. (2007), a ligação covalente multipontual aumenta a rigidez da estrutura tridimensional da molécula da enzima, promovendo maior estabilidade na presença de agentes inativantes como temperatura, pH, solventes orgânicos dentre outros. Para que ocorra a ligação multipontual algumas características são requeridas pelo suporte, como: grupos reativos estáveis o bastante para que ocorra ligação enzima-suporte por períodos longos, grande área superficial interna, alta densidade superficial de grupos reativos e mínimo impedimento estérico dos grupos reativos.

2.5.1.3 Imobilização por ligações iônicas

A ligação iônica acontece quando um suporte sólido contém trocadores de íons que promovem a ligação iônica com a enzima. Esse tipo de ligação é mais forte que as ligações por adsorção física, porém é uma ligação mais fraca quando comparada com a ligação covalente. O método tem baixo custo, é simples, possibilita a reutilização do suporte, além de obter enzimas imobilizadas com alta atividade, porém a ligação iônica pode ser rompida desprendendo a enzima do suporte, em decorrência de variações de pH e força iônica do meio (MOHAMAD et al., 2015).

Com base nessa ligação, Guidini et al., 2011 avaliaram a cinética da reação de hidrólise da lactose. Foi utilizado β -galactosidase de *A. oryzae* imobilizada em resina de troca iônica Duolite A-568 por combinação de ligação iônica e reticulação com glutaraldeído. O melhor ajuste foi obtido com o método de Michales-Menten com inibição competitiva pela galactose.

2.5.2 Imobilização por retenção física

A retenção física, ou aprisionamento, é o método de imobilização no qual as enzimas são ocluídas em redes poliméricas. O processo é simples e não altera quimicamente as enzimas. A retenção pode ser feita em matriz, na qual as enzimas são confinadas em lacunas da matriz polimérica, formadas ao redor do biocatalisador. Em membranas as enzimas são envolvidas em membranas semipermeáveis ou em micelas reversas e em microcápsulas, que utiliza membranas pré-formadas (SIRISHA; JAIN; JAIN, 2016).

São utilizadas matrizes constituídas de materiais poliméricos, como alginato de cálcio, ágar, poliacrilamida e colágeno. Também é possível utilizar algumas matrizes sólidas como carvão ativado, cerâmica porosa e terra diatomácea. E as membranas que são utilizadas são de náilon, celulose, polissulfona e poliacrilamida (PANESAR; KUMARI; PANESAR, 2010).

Por meio de retenção física, Argenta; Nogueira; Scheer (2021) imobilizaram β -galactosidase de *K. lactis* em esferas de alginato de cálcio e avaliaram a hidrólise da lactose do soro de leite. O aprisionamento em alginato levou a uma eficiência de 79,8% e um rendimento de 85,2% da imobilização, além de aumentar a estabilidade térmica e ao armazenamento. Wolf; Tambourgi; Paulino (2021) avaliaram a hidrólise da lactose com β -galactosidase de *K. lactis* imobilizada em hidrogéis à base de goma arábica e quitosana, a imobilização aumentou a estabilidade em pHs mais ácidos.

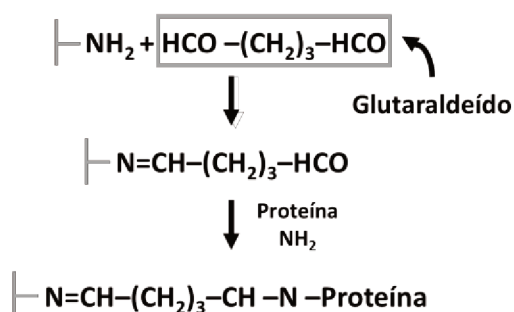
2.5.3 Imobilização por ligação cruzada

A ligação cruzada é um método de imobilização reversível que não utiliza suporte para ligação da enzima. As moléculas da enzima são ligadas umas às outras por reagentes reticulantes tais como glutaraldeído e proteínas inativas, como gelatina e albumina, formando uma estrutura tridimensional complexa. O que ocorre é a reticulação realizada por formação de ligações cruzadas intermoleculares da enzima por ação de reagentes bi ou multifuncionais (SHELDON, 2007; MOHAMAD et al., 2015).

O reticulante mais utilizado é o glutaraldeído, que é econômico e facilmente obtido em grandes quantidades. A reticulação acontece por meio da reação do grupo amino livre de resíduos de lisina da superfície da enzima, com oligômeros ou polímeros do glutaraldeído, que são produtos de aldol intermolecular e intramolecular de reações de condensações, como ilustrado na Figura 2.4 (MOHAMAD et al., 2015).

A ligação cruzada pode ser obtida utilizando cristais de enzimas (*CLEC-crosslinked enzymes crystals*), formando agregados físicos por precipitação, seguido de entrecruzamento (CLEAs – *crosslinked enzymes aggregates*) das enzimas do agregado. A precipitação pode ser feita com acetona, sulfato de amônio e etanol. A aplicação dos CLEAs é simples e ajuda a conservar a atividade, contribuindo para sanar o problema de alta demanda da enzima, que acarreta em baixas retenções de atividade, estabilidade e baixa reprodutibilidade, o que dificulta a aplicação industrial (SHELDON, 2007; MOHAMAD et al., 2015).

Figura 2.4 - Mecanismo de reação cross-linking com glutaraldeído



Fonte: Adaptada de WANG, 1976

Esse tipo de imobilização é dependente de quantidade de agente ligante, meio de imobilização, pH, temperatura, força iônica e precipitantes, que podem afetar a atividade e

estabilidade das enzimas. A técnica é melhor executada quando realizada em união com outros métodos de imobilização. Apesar das vantagens, a reticulação pode acarretar em mudanças no sítio ativo das enzimas levando a perda de atividade (MATEO et al., 2007; HUSAIN et al., 2011).

O *cross-linking* tem sido utilizado também para a imobilização da β -galactosidase. Klein et al. (2016) alcançaram maior estabilidade e estrutura rígida de β -galactosidase de *A. oryzae*, após imobilização por *cross-linking* em quitosana, utilizando genipina como reticulante. Lima et al. (2021) também realizaram *cross-linking* da enzima β -galactosidase de *K. lactis* em quitosana ativada com genipina, como resultados alcançaram melhor estabilidade térmica e melhor resistência mecânica.

2.5.4 Suportes para imobilização

Vários materiais podem ser utilizados como suportes nos processos de imobilização de enzimas. É necessário compreender os diferentes grupos de materiais nos quais as enzimas possam se ligar, uma vez que eles podem afetar toda a aplicabilidade da enzima no processo. Fatores como pH, morfologia, composição, resistência mecânica, carga, presença de íons, possibilidade de modificações físicas e químicas, natureza hidrofóbica ou hidrofílica, devem ser verificados. O suporte deve ser eficaz no processo de imobilização, cumprindo o que é desejável na sua aplicação, as características da enzima também devem ser consideradas (FOPASE et al., 2020; WAHAB et al., 2020).

De forma geral, os suportes devem apresentar boa estabilidade, serem facilmente disponíveis, apresentarem baixo custo, terem alta afinidade com a enzima, ter resistência a solventes orgânicos, estabilidade a variações de pressão, pH, temperatura e ataques microbiológicos, alta força mecânica, durabilidade e possibilidade de reutilização, grande área superficial, boa porosidade, tamanho e forma apropriada. Os suportes podem ser orgânicos (agar, celulose, quitosana, nylon, poliacrilatos, outros) ou inorgânicos (areia, argila, vidro, sílica, cerâmica, outros) de acordo com sua composição. (MILETIC; NASTASOVIC; LOOS, 2012; WAHAB et al., 2020).

Diversos estudos avaliaram os diferentes suportes para imobilização da β -galactosidase como alginato (ARGENTA; NOGUEIRA; SCHEER, 2021), quitosana (KLEIN et al., 2016; URRUTIA et al., 2018; HACKENHAAR et al., 2021; LIMA et al., 2021; WOLF; TAMBOURGI; PAULINO, 2021), resina Duolite A-568 (GUARDEZ et al., 2012; FISCHER

et al., 2013; FALLEIROS et al., 2017; SOUSA et al., 2021), esferas de vidro (ESKANDARLOO; ABBASPOURRAD, 2018), Eupergit® C (CAMPELLO et al., 2012; BRAGA et al., 2014), sílica (GONZALEZ-DELGADO et al., 2018; MUKUNDAN et al., 2020; TIZCHANG et al., 2020), hidrogéis de pectina (CARGNIN; GASPAR; PAULINO, 2020), nanopartículas de prata (ANSARI et al., 2012; ARSALAN et al., 2020).

Os suportes inorgânicos estão sendo bastante aplicados aos processos de imobilização, por apresentarem boa porosidade, boa resistência térmica, mecânica e microbiana.

2.5.4.1 Sílica

A sílica (SiO_2) é um dos suportes com destaque nos processos de imobilização de enzimas. Apresenta grande área superficial e pode ser facilmente modificada em grupos funcionais distintos para imobilização da enzima, além disso fornece alta resistência física, química e biológica, tem boa resistência térmica e mecânica. Possuem uma natureza mesoporosa, contendo poros pequenos e uniformes que podem variar de 2 a 50 nm, possuem também uma grande área superficial que podem chegar a $1500 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$. A sílica pode encapsular as enzimas em seus poros, proporcionando um ambiente mais estável, comparando com uma superfície plana (FOPASE et al., 2018). Em muitos estudos foram relatados o aumento da estabilidade e a atividade catalítica das enzimas imobilizadas em sílica (RICARDI et al., 2018; TIZCHANG et al., 2020).

Os suportes à base de sílica que são utilizados nas metodologias de imobilização incluem sílica mesoporosa, sílica gel, SBA-15, nanocompósito de sílica, nanotubos de sílica e aerogel (FOPASE et al., 2018).

A sílica permite modificação química da sua superfície levando a diferentes abordagens para ligação covalente de uma enzima (SNOCH et al., 2019). Essa grande modificação das sílicas se deve à presença de grupos silanóis em sua superfície, que podem ser funcionalizados com agentes silanizadores, que promovem a silanização com organosilanos, que é a reação entre os grupos reativos do tipo alcoxi presentes em alcoxisilanos e os silanóis superficiais da sílica (CARVALHO; LIMA; SOARES, 2015).

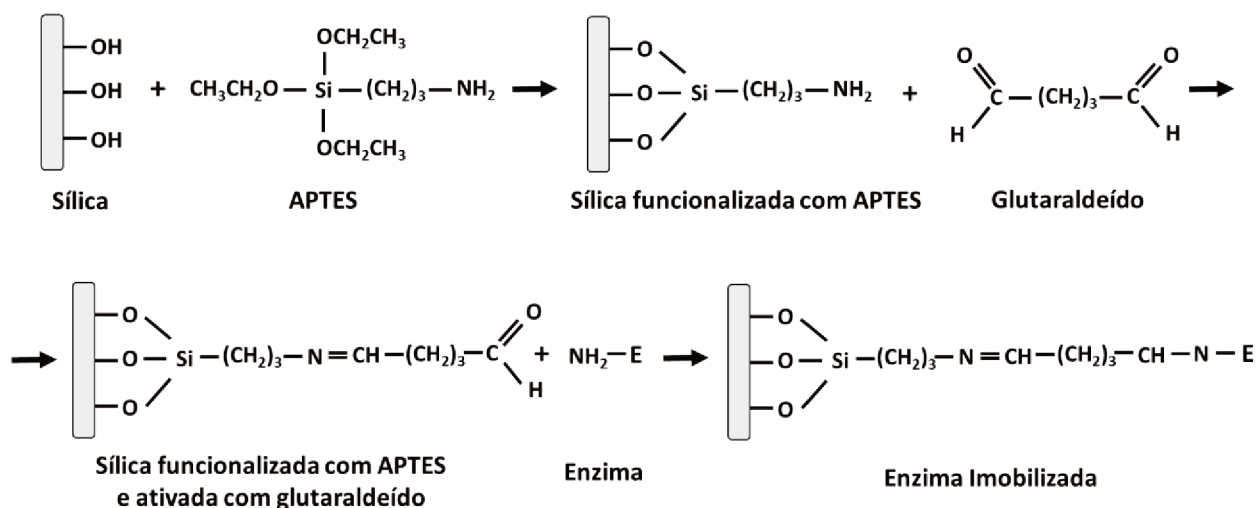
A funcionalização acontece nas extremidades NH_2 na superfície da sílica. Os grupos Si-OH e silanol (Si-O-Si) na sílica oxidada reagem com os grupos funcionais (epóxi ou metoxi) dos silanos, assim ocorre a hidrólise dos grupos hidroxilas e há formação de ligações de hidrogênio, essas ligações fortalecem as forças de Van Der Waals e serve como âncora na

formação das ligações covalentes na superfície da sílica. Dentre os silanos estão 3-aminopropiltrimetoxissilano, 3-aminopropiltriethoxissilano (APTES), tetraethoxissilano (TEOS) e 3-cloropropiltrimetoxissilano. O processo de silanização pode ser de forma aquosa ou com solventes orgânicos. A via aquosa forma uma monocamada de silano na superfície do suporte, por utilização de solventes orgânicos há uma maior carga de amina no suporte, porém maior durabilidade do suporte é alcançada por silanização aquosa (CARVALHO; LIMA; SOARES, 2015; WEETALL, 1976; RIBEIRO, 1989).

A enzima pode ser ligada diretamente à superfície da sílica, entretanto a ligação direta pode limitar a transferência de massa. Assim, utiliza-se um ligante que facilita a imobilização covalente. Dentre os ligantes usa-se o glutaraldeído, carbodiimida, polietilenoglicol (PEG), sendo o glutaraldeído o mais aplicado aos processos (CARVALHO; LIMA; SOARES, 2015; FOPASE et al., 2018).

A sílica tem em sua superfície os grupos -OH que reagem com os silanos e fornece os grupos aminos, que irão reagir com a extremidade do glutaraldeído, a outra extremidade do glutaraldeído se liga aos grupos funcionais da enzima promovendo a imobilização covalente, o processo é ilustrado na Figura 2.5.

Figura 2.5 - Funcionalização da sílica com APTES, posterior ativação com glutaraldeído e imobilização da enzima



Fonte: Adaptada de ZHANG et al., 2016

Estudos relatam a utilização de sílica para imobilização de β -galactosidase para aplicação na hidrólise da lactose e na produção de GOS. González-Delgado et al. (2018)

realizaram a imobilização de β -galactosidase de *A. aculeatus* em sílica mesoporosa, de poros grandes, o suporte foi silanizado com 3-glicidiloxipropiltrimetoxissilano (GPTMS). A enzima imobilizada apresentou altos rendimentos de GOS, se sobressaindo em relação a enzima livre. Tizchang et al. (2020) otimizaram a imobilização de β -galactosidase em nanopartículas de dióxido de silício para hidrólise da lactose, a eficiência da imobilização alcançada foi de 87%, a imobilização ampliou a faixa de pH, temperatura e armazenamento.

2.6 GALACTO-OLIGOSSACARÍDEOS (GOS)

Os GOS são oligossacarídeos não digeríveis, que são sintetizados a partir de lactose. Possuem de 2 a 8 resíduos de monossacarídeos, o terminal é glicose e as outras unidades são galactose unidas por ligações β -glicosídicas. Esse tipo de ligação torna os GOS indigeríveis no trato intestinal superior, considerando que as enzimas digestivas são mais específicas para as ligações α -glicosídicas. Assim, ao chegarem ao cólon os GOS são fermentados por bactérias do intestino trazendo benefícios ao organismo humano, apresentando propriedades prebióticas. Essas características elevaram o interesse por esses oligossacarídeos, devido à crescente demanda por alimentos funcionais, que apresentam vantagens nutricionais e são também uma possibilidade de expansão no mercado de alimentos (FAI; PASTORE, 2015; PANESAR et al., 2018; NARISSETTY et al., 2022).

Os GOS, além do efeito prebiótico, apresentam outros aspectos tecnológicos e nutricionais como alta solubilidade, estabilidade térmica, baixo poder adoçante e baixo índice glicêmico. Eles estão sendo aplicados como ingrediente funcional em fórmula infantil, bebidas, produtos de panificação, laticínios e sorvetes. Também é importante mencionar que os GOS, são considerados alimentos seguros para consumo, possuem status GRAS (*Generally Recognized as Safe*) (TOMAL et al., 2010; FAI; PASTORE, 2015; VÉNICA et al., 2020).

Os GOS são adicionados em diversos produtos. O pão é um dos alimentos que é bem apropriado para adição dos GOS, pois eles não são degradados durante a fermentação e aquecimento, além disso agregam qualidade ao sabor e a textura. Outros alimentos são os lácteos fermentados, que já são comercializados com a adição de GOS. Os alimentos infantis, especiais para idosos e para imuno-deficientes também podem utilizar os GOS, sendo esses indivíduos mais susceptíveis a problemas intestinais (FAI; PASTORE, 2015). Neste contexto, fica nítido a relevância dos GOS e quão grande é o potencial para aplicação em alimentos, trazendo benefícios para saúde humana.

2.6.1 Efeitos no organismo

Como já mencionado, os GOS apresentam características benéficas ao organismo humano, possuem propriedades prebióticas. A Associação Científica Internacional de Probióticos e Prebióticos (ISAPP) define prebiótico como um substrato que é utilizado seletivamente pelos microrganismos hospedeiros conferindo benefício a saúde (ISSAP, 2021). Os prebióticos exercem um aumento na biomassa microbiana, resultante da sua fermentação, aumentando assim o número de evacuações. As alterações na microflora intestinal são significativas para reduzir produtos putrefativos nas fezes, diminuir colesterol no sangue e diminuir a incidência de câncer de colorretal (MARTINS; BURKERT, 2009; FAI; PASTORE, 2015).

Os prebióticos mais conhecidos e que apresentam mais evidências sobre seus efeitos na saúde são os carboidratos não digeríveis, como os frutanos (fruto-oligossacarídeos ou FOS e inulina) e os galactanos (galacto-oligossacarídeos ou GOS). Esses prebióticos estão comercialmente disponíveis e podem ser obtidos de fontes naturais ou por meio de rotas biotecnológicas (GIBSON et al., 2017; ROSA et al., 2021).

Desse modo, podem ser atribuídos aos GOS, vários benefícios, tais como: modificação da microflora colonizadora do cólon, estímulo na produção de nutrientes, decréscimos no pH do cólon com maior incidência de ácidos graxos de cadeia curta, aumento da umidade do bolo fecal por meio da pressão osmótica, proteção contra infecções gastrointestinais, respiratório e urogenital, melhora na absorção de nutrientes, tem efeito positivo no metabolismo de carboidratos e lipídeos e diminui o risco de câncer de cólon (MARTINS; BURKERT, 2009; TOMAL et al., 2010).

Além disso, aos GOS têm sido atribuído efeitos imunomoduladores. Yousefi et al. (2018) investigaram o efeito de diferentes níveis de GOS sobre genes relacionados a imunidade em peixe-zebra. Como resultados foi considerado que o GOS tem efeito como imunoestimulante e aumenta os parâmetros imunológicos e a expressão de genes relacionados ao sistema imunológico. Porém, não apresentou efeito sobre o crescimento dos peixes. Mortaz et al., 2022 avaliaram a eficácia dos GOS e de 2'-fucosilactose (oligossacarídeo específico do leite humano) em várias concentrações no crescimento de bactérias gram-positivas e gram-negativas e na fagocitose de neutrófilos dessas bactérias. Eles concluíram que GOS e 2'-fucosilactose suprimiram o tempo de atraso bacteriano e o crescimento dos microrganismos. Mostrando que GOS e o 2'- fucosilactose possuem propriedades antibacterianas e podem inibir

o crescimento de bactérias patogênicas e aumentar a capacidade de fagocitose das bactérias pelos neutrófilos.

Com intuito de avaliar todas essas propriedades dos GOS, vários estudos estão sendo realizados. Hajjar et al. (2021) avaliaram a cicatrização pós-cirúrgica do cólon de camundongos que foram suplementados com GOS. A suplementação foi capaz de acelerar a recuperação de peso corporal, aumentando a parede do cólon, a mucosa foi fortalecida e de forma geral os camundongos que ingeriram GOS apresentaram melhor cicatrização pós cirúrgica. O estudo dá uma boa previsão para análises em humanos. Willms et al. (2021) avaliaram a suplementação de adultos (25 a 50 anos) e idosos (70 a 75 anos) com GOS, a suplementação foi realizada durante quatro semanas, os resultados mostraram que ambos os grupos aumentaram significativamente a população de *Bifidobacterium*, microrganismo benéfico para flora intestinal. O que é positivo para saúde, porém não houve diferença significativa em relação as funções imunológicas.

Com base nas propriedades e nos estudos mencionados, a produção dos GOS se faz necessária, sendo uma possibilidade interessante da sua aplicação no mercado e contribuindo para saúde da sociedade de uma forma geral.

2.6.2 Síntese dos galacto-oligossacarídeos

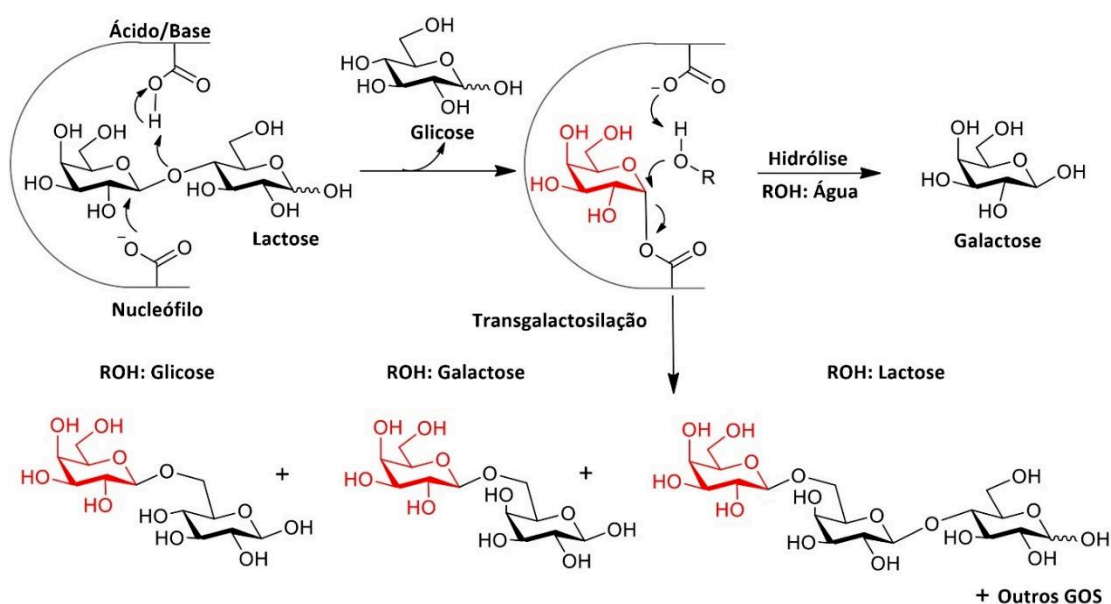
Na natureza os GOS são encontrados, por exemplo, em leite humano, cebola, alho, banana, soja, e chicória, entre outros e podem ser sintetizados por via química ou enzimática. A síntese mais usual é a enzimática, é econômica e gera poucos subprodutos. A via química é mais complexa, são necessárias várias etapas de proteção e desproteção das hidroxilas dos açúcares, o que leva a baixos rendimentos e também são utilizados ácidos que podem impactar o meio ambiente (PANESAR et al., 2018).

Na síntese enzimática a β -galactosidase é a enzima responsável pela reação de transgalactosilação da galactose a partir de lactose. Ela pode ser utilizada em sua forma livre ou imobilizada por diferentes métodos e suportes. As fontes de lactose podem ser o leite e os seus subprodutos como soro de leite e permeado de soro (MARTINS; BURKERT, 2009; PANESAR et al., 2018).

A β -galactosidase também realiza a hidrólise da lactose e para que ocorra a transgalactosilação e não a hidrólise, a reação deve ocorrer em substratos com altas concentrações de lactose. A Figura 2.6 apresenta a reação, no início tem a formação do

complexo enzima-galactosil e simultânea liberação de glicose da lactose, em seguida ocorre a degalactosilação, o resíduo ácido-base ativa a molécula receptora, que age sob o intermediário da enzima galactosil, se o aceptor for água ocorre hidrólise, caso seja um açúcar, acontece a transgalactosilação e produção dos GOS (LU et al., 2020).

Figura 2.6 - Mecanismo da reação de transgalactosilação da β -galactosidase



Fonte: Adaptada de LU et al., 2020

Os GOS produzidos por β -galactosidases são uma mistura de oligossacarídeos transgalactosilados, lactose que não reagiu, glicose e galactose. A eficiência da transgalactosilação e o tipo de produtos a serem obtidos dependem da enzima e das condições da reação. O modelo de inibição competitiva pode prever a cinética da conversão da lactose. No início da reação a galactose formada competirá com a lactose pelos sítios ativos da enzima (MARTINS; BURKERT, 2009; LU et al., 2019).

A fonte de obtenção da β -galactosidase afeta diretamente a síntese de GOS, as enzimas podem apresentar diferentes seletividade à água e às moléculas de açúcar, mesmo em condições de concentrações de lactose iguais o rendimento de GOS, as estruturas e os tipos de ligação glicosídicas podem ser diferentes (FAI; PASTORE, 2015; LU et al., 2019).

Além da fonte enzimática, o tempo de reação, temperatura e concentração de lactose são variáveis que afetam a produção de GOS. Inicialmente uma maior concentração de lactose favorece a reação de transgalactosilação, assim o rendimento de GOS será crescente até um máximo, em seguida a reação de hidrólise é beneficiada, consequentemente diminuindo o

rendimento de GOS. A concentração de GOS também pode ser influenciada por outros fatores como a fonte e concentração da enzima, pH do meio, temperatura e tipo de processo (PANESAR et al., 2018).

A reação também é dependente do tempo, que deve ser controlado, fazendo a interrupção da reação no momento em que a produção de GOS for alta. A temperatura influencia a velocidade da reação, a solubilidade da lactose e a estabilidade da enzima. O aumento de temperatura eleva a taxa de reação e proporciona maior solubilidade da lactose, produzindo mais GOS, contudo a temperatura pode inativar a enzima (GOSLING et al., 2010; PANESAR et al., 2018).

O pH também pode afetar a cinética da hidrólise da lactose e a síntese de GOS pela β -galactosidase. O que mostra que pode ser possível controlar taxas de síntese e degradação de GOS variando o pH do meio de reação, aumentando assim os rendimentos. Todavia, esta é uma característica que varia entre as enzimas, conforme suas regiões ótimas de pH a depender de sua fonte de origem (GOSLING et al., 2010).

Alguns monossacarídeos como a galactose e a glicose podem ser inibidores da reação de transgalactosilação. A galactose compete com a lactose pelo sítio ativo da β -galactosidase. A inibição por glicose é um processo mais complexo e estará vinculado à fonte enzimática, podendo ser competitivo ou não-competitivo (PANESAR et al., 2018).

A estrutura dos GOS é variada, sendo menos comum a obtenção de oligossacarídeos com cadeias extensas. Mahoney (1998) sugeriu que a produção de GOS de altas massas moleculares é limitada devido à competição da reação de hidrólise e transgalactosilação catalisada pela β -galactosidase. Além disso, na transgalactosilação quanto maior for o peso molecular do açúcar receptor menor será a eficiência da reação. Desse modo, são formados mais di, tri e tetrassacarídeos do que oligossacarídeos de cadeias maiores. Em relação à estrutura química, os GOS podem se diferenciar em relação a composição, regioquímica, grau de polimerização e ligação glicosídica. Na Tabela 2.3 são apresentados alguns tipos de GOS que podem ser sintetizados.

A síntese dos GOS pode ser bem variada, com diferentes fontes enzimáticas e condições de processo, neste contexto muitos estudos estão sendo desenvolvidos com diversos processos, com a utilização de β -galactosidase de diferentes microrganismos, além da utilização de metodologias de imobilização. A Tabela 2.4 apresenta alguns desses estudos.

Tabela 2.3 - Estruturas dos GOS formados a partir da transgalactosilação com β -galactosidase

Dissacarídeos	β -D-Gal (1 $\rightarrow$ 6)-D-Glc	Alolactose
	β -D-Gal (1 $\rightarrow$ 6)-D-Gal	Galactobiose
	β -D-Gal (1 $\rightarrow$ 3)-D-Glc	
	β -D-Gal (1 $\rightarrow$ 2)-D-Glc	
	β -D-Gal (1 $\rightarrow$ 3)-D-Gal	
Trissacarídeos	β -D-Gal (1 $\rightarrow$ 6)- β -D-Gal (1 $\rightarrow$ 6)-D-Glc	6'dilactosil-glicose
	β -D-Gal (1 $\rightarrow$ 6)- β -D-Gal (1 $\rightarrow$ 4)-D-Glc	6'galactosil-lactose
	β -D-Gal (1 $\rightarrow$ 6)- β -D-Gal (1 $\rightarrow$ 6)-D-Gal	6'galactotriose
	β -D-Gal (1 $\rightarrow$ 3)- β -D-Gal (1 $\rightarrow$ 4)-D-Glc	3'galactosil-lactose
	β -D-Gal (1 $\rightarrow$ 4)- β -D-Gal (1 $\rightarrow$ 4)-D-Glc	4'galactosil-lactose
Tetrassacarídeos	β -D-Gal (1 $\rightarrow$ 6)- β -D-Gal (1 $\rightarrow$ 6)- β -D-Gal (1 $\rightarrow$ 4)-D-Glc	6'digalactosil-lactose
	β -D-Gal (1 $\rightarrow$ 6)- β -D-Gal (1 $\rightarrow$ 3)- β -D-Gal (1 $\rightarrow$ 4)-D-Glc	
	β -D-Gal (1 $\rightarrow$ 3)- β -D-Gal (1 $\rightarrow$ 6)- β -D-Gal (1 $\rightarrow$ 4)-D-Glc	
Pentassacarídeos	β -D-Gal (1 $\rightarrow$ 6)- β -D-Gal (1 $\rightarrow$ 6)- β -D-Gal (1 $\rightarrow$ 6)- β -D-Gal (1 $\rightarrow$ 4)-D-Glc	6'trigalactosil-lactose

*Gal: galactose; Glc: glicose

Fonte: MAHONEY, 1998; FAI; PASTORE, 2015

Tabela 2.4 - Diferentes condições para síntese enzimática dos GOS

Forma da β -galactosidase	Fonte Enzimática	T (°C)	pH	t (h)	Lactose (g.L ⁻¹)	Rendimento de GOS (%)	Referência
Livre	<i>K.lactis</i>	40	7,0	3,0	250	12,18	Gonzalez-Delgado et al. (2016)
Livre	<i>Paenibacillus barengoltzii</i>	40	7,5	8,0	350	47,90	Liu et al. (2017)
Livre	<i>Pediococcus acidilactici</i>	47,5	7,0	--	300	--	Chanalia et al. (2018)
Livre	<i>A. oryzae</i>	40	4,5	7,0	600	59,7	Gao; Wu; Wu (2019)
Livre	<i>A. oryzae</i>	50	4,5	0,42	500	25,1	Wang et al. (2020)
Livre	<i>Pantoe anthophila</i>	50	7,0	6,0	300	38,0	Yáñez-Neco et al. (2021)
Permeabilizada	<i>K. lactis</i>	40	8,0	1,5	352	35,0	Sun et al. (2016)
Imobilizada (Sílica)	<i>B. circullans</i>	59	6,5	24	250	20,2	Gonzalez-Delgado et al. (2018)
Imobilizada (Resina)	<i>L. acidophilus</i>	50	6,8	15	400	--	Carevic et al. 2018

Como apresentado são muitas as variáveis que podem contribuir ou não para produção dos GOS e definir suas características. Dessa forma, também são avaliadas diferentes configurações de reatores para síntese desses GOS. Um tipo que tem sido bastante utilizado é reator de leito fixo. No leito fixo a enzima imobilizada é empacotada, permanecendo estacionária, enquanto a solução de substrato é bombeada através dele, o fluxo pode ser ascendente, descendente e com corrente de reciclo (PRADELLA, 2001). Sen et al. (2014)

avaliaram a produção de GOS com β -galactosidase de *B. circullans* microencapsulada em alginato de cálcio em reator de leito fixo. A produção foi realizada em pH 6,5, com diferentes vazões de solução de lactose e foi observado o aumento na produção de GOS com a elevação da temperatura de 288 K (14,85 °C) para 308 K (34,85 °C). A concentração de lactose de 200 kg.m⁻³ apresentou uma produção de GOS de 40 kg.m⁻³ em 308 K (34,85 °C). Eskandarloo; Abbaspourrad (2018) utilizaram um leito fixo com β -galactosidase de *A. oryzae* imobilizada em contas de vidro e alcançaram um rendimento de 25,2% com uma vazão de alimentação de 0,5 mL.h⁻¹ em temperatura de 60 °C, a conversão de lactose foi de 43,9%. Foi avaliado também a utilização de uma corrente de reciclo que promoveu aumento no rendimento de GOS para 39,3% no segundo ciclo.

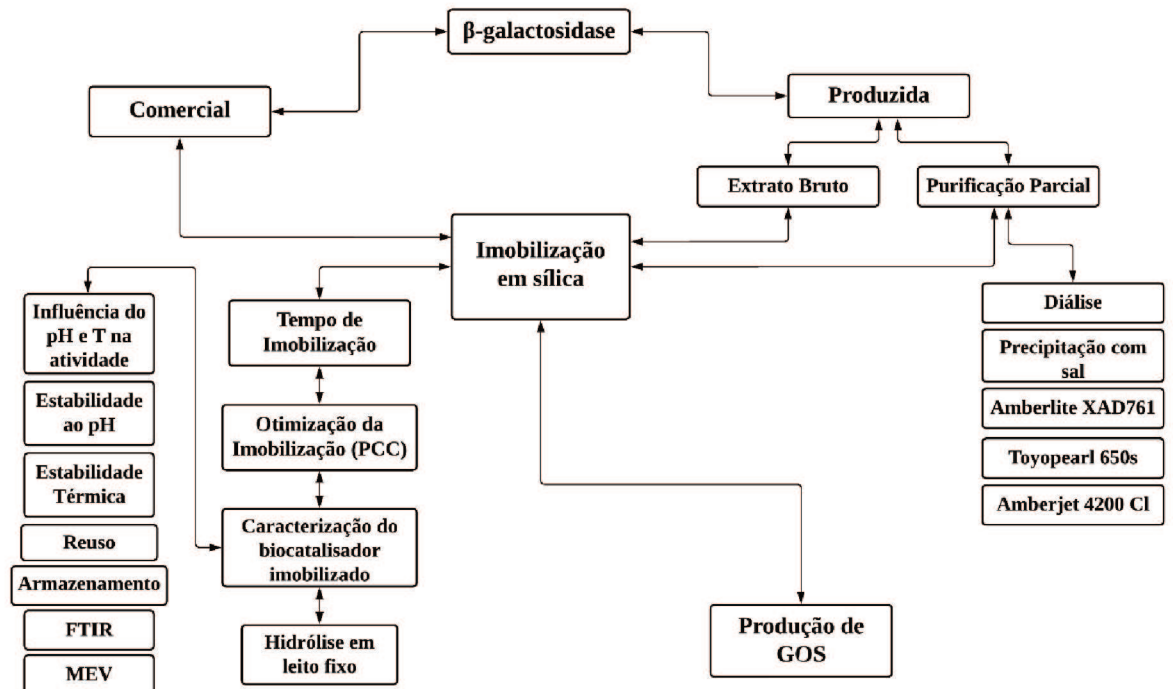
Os estudos mais recentes utilizaram técnicas de modificações genéticas e fontes enzimáticas alternativas (LIU et al., 2017; YÃNEZ-NECO et al., 2021). Entretanto, a aplicação de diferentes processos de imobilização com fontes enzimáticas já conhecidas tem um potencial na obtenção dos GOS, uma vez que bons resultados já foram obtidos e ainda podem surgir novas metodologias promissoras.

CAPÍTULO 3

MATERIAL E MÉTODOS

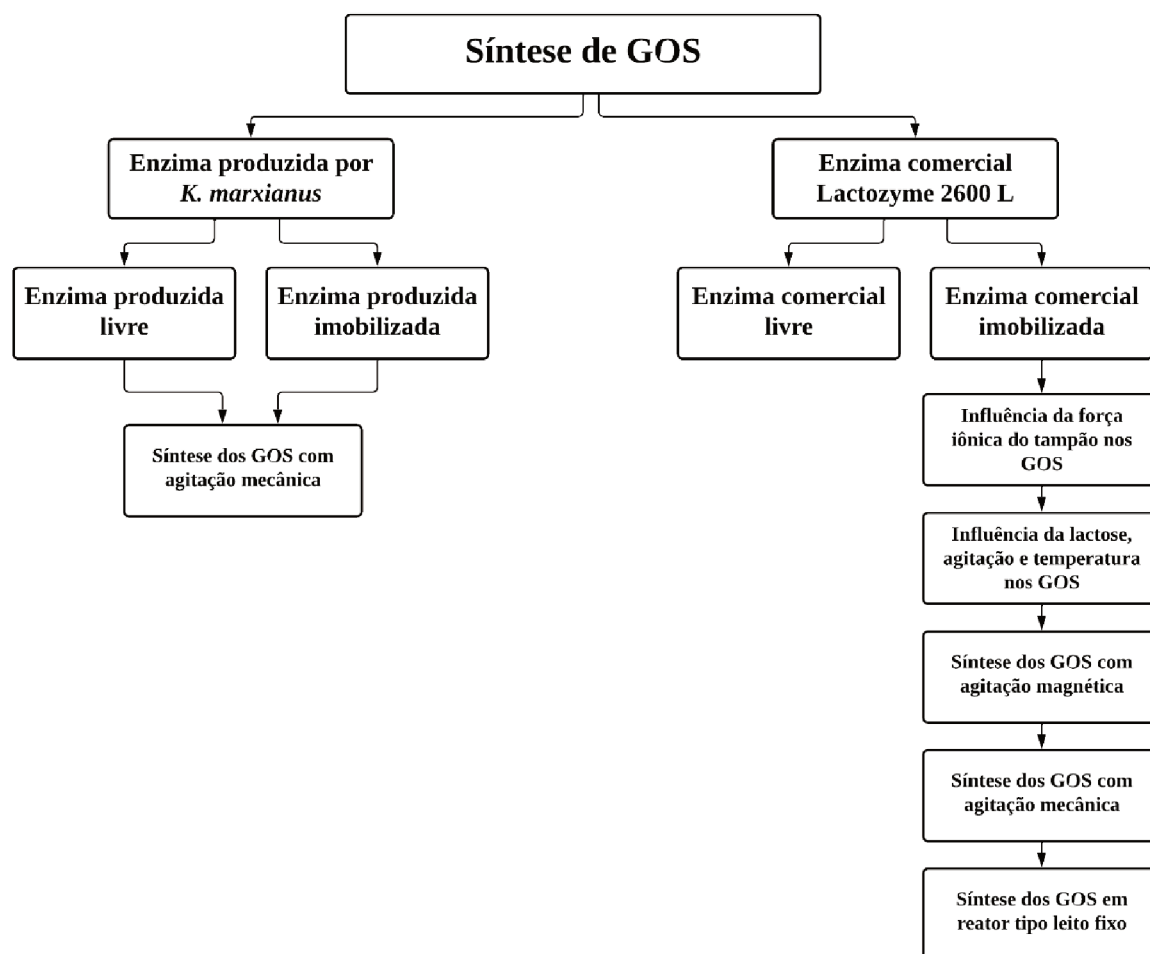
O material utilizado, o desenvolvimento experimental do trabalho e também a metodologia empregada são descritos neste capítulo. Na Figura 3.1 e 3.2 são apresentadas em fluxogramas as etapas estudadas neste trabalho.

Figura 3.1 - Fluxograma de desenvolvimento da metodologia experimental: Imobilização da enzima β -galactosidase em sílica



Fonte: A Autora

Figura 3.2 - Fluxograma de desenvolvimento da metodologia experimental: Síntese dos galacto-oligossacarídeos



Fonte: A Autora

3.1 MATERIAL

3.1.1 Enzimas

No presente trabalho foram empregadas duas enzimas, uma comercial e outra produzida no Laboratório de Engenharia Bioquímica da Faculdade de Engenharia Química da UFU. A β -galactosidase comercial foi a Lactozyme[®] 2600 L de *Kluyveromyces lactis* obtida da empresa Sigma-Aldrich, disponível em forma líquida. A outra foi a enzima β -galactosidase produzida por fermentação empregando a levedura *Kluyveromyces marxianus* ATCC 46537, proveniente da Coleção de Culturas Tropicais da Fundação André Tosello de Campinas (SP), na forma reativada (*slant* sem duplicata). O Anexo A apresenta o certificado de análise.

3.1.1.1 Manutenção da cultura

Conforme recomendado pela Fundação André Tosello, a cultura foi mantida a 4 °C em meio YMA (*Yeast-Malt Extract Agar*). Na Tabela 3.1 pode ser visto a composição do meio de manutenção (YMA). A cultura foi repicada mensalmente.

Tabela 3.1 - Composição do Meio de Manutenção YMA

Componentes	Concentração (g.L ⁻¹)
Extrato de levedura	3,0
Extrato de malte	3,0
Peptona	5,0
Glicose	10,0
Agar	20,0

3.1.2 Suporte para imobilização

Para imobilização da enzima β -galactosidase, utilizou-se Sílica de Porosidade Controlada, correspondente a fração que passou pela peneira Tyler 32 e que ficou retida na Tyler 35, obtida da Corning Glass Works, com diâmetro médio de poro de 375 Å (Angstrom), mostrada na Figura 3.3 (RIBEIRO, 1989).

Figura 3.3 - Sílica de porosidade controlada



Fonte: A Autora

3.1.3 Substratos

3.1.3.1 Lactose

A lactose (PA) foi utilizada para preparação da solução para determinação da atividade enzimática e também como substrato na produção dos galacto-oligossacarídeos.

3.1.3.2 Substrato para determinação da atividade enzimática

A atividade catalítica da enzima β -galactosidase foi determinada com solução de lactose (PA) 50 g.L⁻¹ preparada em tampão láctico pH 7,0 recomendado pela Novo Nordisk (1993). A Tabela 3.2 apresenta a composição do referido tampão.

Tabela 3.2 - Composição do Tampão Láctico	
Componentes	Concentração (g.L ⁻¹)
C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ . 2 H ₂ O	0,795
C ₆ H ₈ O ₇ . H ₂ O	1,663
K ₂ SO ₄	0,180
K ₂ HPO ₄	0,520
KH ₂ PO ₄	1,470
KOH	1,090
MgCl ₂ .6 H ₂ O	0,830
CaCl ₂ .2 H ₂ O	0,750
NaOH	0,800
NaHCO ₃	0,280
Fonte: NOVO NORDISK, 1993	

3.1.3.3 Substratos para produção da β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus*

Permeado de soro de leite: comercializado na forma de pó foi utilizado como principal fonte de carbono na formulação dos meios de cultura para o crescimento da levedura *K. marxianus* ATCC 46537. O produto foi obtido da empresa SOORO de Marechal Cândido Rondon no Estado do Paraná, as especificações técnicas são apresentadas no Anexo B. O teor de lactose

foi avaliado por leitura em HPLC (High Performance Liquid Chromatography - Cromatografia Líquida de Alta Performance) para aplicação nos meios de cultura das fermentações.

Inóculo: O meio de cultura utilizado para cultivo da levedura *K. marxianus* ATCC 46537 foi baseado no meio proposto e otimizado por Falleiros (2016), apresentado na Tabela 3.3. O principal componente do meio foi o permeado do soro de leite, que contém como fonte principal de carbono a lactose. Foi preparado em tampão fosfato 0,2 M pH 5,5. A cultura foi mantida a 30 °C, 120 rpm por 14 horas em incubadora rotatória. Com exceção da lactose que foi obtida a partir do permeado de soro de leite, os reagentes utilizados foram de grau analítico.

Tabela 3.3 - Composição do meio inóculo para cultivo da *K. marxianus*

Componentes	Concentração (g.L ⁻¹)
Lactose (Permeado de Soro)	50,0
Extrato de Levedura	6,0
(NH ₄) ₂ SO ₄	6,0
KH ₂ PO ₄	5,0
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,6

Fonte: FALLEIROS, 2016

Meio de cultura para fermentação: O meio de cultura utilizado para fermentação da levedura *K. marxianus* ATCC 46537 foi similar ao utilizado no cultivo da levedura, porém em concentrações maiores de permeado de soro de leite e (NH₄)₂SO₄ e na ausência de extrato de levedura, preparado em tampão fosfato 0,2 M pH 7,0, conforme a Tabela 3.4.

Tabela 3.4 - Composição do meio de cultura para fermentação da *K. marxianus*

Componentes	Concentração (g.L ⁻¹)
Lactose (Permeado de Soro)	100
(NH ₄) ₂ SO ₄	6,26
KH ₂ PO ₄	5,0
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,6

Fonte: FALLEIROS, 2016

3.1.4 Unidade Experimental

As unidades experimentais foram montadas no Laboratório de Engenharia Bioquímica da Faculdade de Engenharia Química da UFU e são descritas a seguir:

3.1.4.1 Unidade experimental para determinação da atividade enzimática

A determinação da atividade enzimática da enzima solúvel (livre) foi realizada utilizando um reator de mistura operado em batelada, com volume útil de 200 mL, com camisa externa para circulação de água proveniente de banho termostaticado para controle da temperatura, submetido à agitação magnética. O reator de mistura apresentava as dimensões de 8,2 cm de altura e 5,5 cm de diâmetro interno (Figura 3.4).

Figura 3.4 - Unidade Experimental para determinação da atividade enzimática para enzima solúvel



Para a determinação da atividade da enzima na forma imobilizada, as partículas do biocatalisador eram acondicionadas em cestas de tela de aço inox de 100 mesh e a cesta inserida dentro do reator de mistura citado acima. As cestas evitaram o atrito entre as partículas de enzimas imobilizadas e o agitador (Figura 3.5).

Figura 3.5 - Unidade Experimental para determinação da atividade da enzima imobilizada

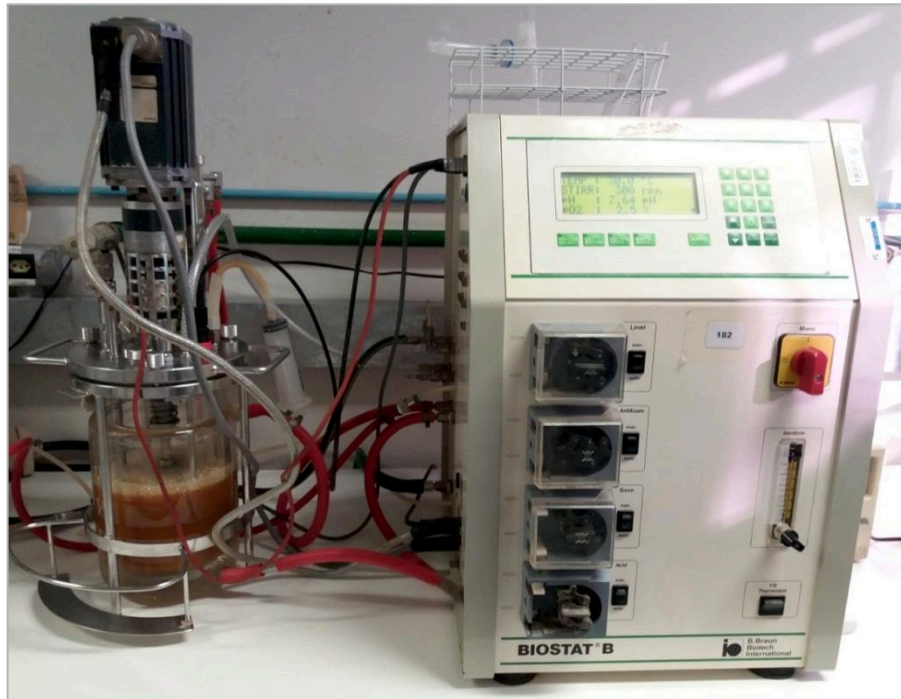


Para maior agilidade na execução dos experimentos, três reatores foram montados em série utilizando o mesmo banho termostatzado, tanto para determinação da atividade enzimática da enzima solúvel quanto para enzima imobilizada.

3.1.4.2 Unidade experimental para produção da β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus*

Fermentação: A enzima β -galactosidase de *K. marxianus* foi produzida por fermentação submersa em duas configurações: reator cônico de bancada e fermentador Biostat® B. Para preparo do inóculo foi utilizado reator cônico de bancada, constituído de erlenmeyer de volume total de 250 mL, fechado com rolha de gaze e algodão hidrófobo. Sendo que, 30% do volume total era ocupado pelo meio de cultura. As fermentações foram realizadas em incubadora rotatória a 120 rpm, 30 °C por 14 horas. O outro reator utilizado foi o fermentador Biostat® B, da marca B. Braun Biotech International, que consiste em um vaso cilíndrico com volume de 2,0 L, fechado com tampa de aço inoxidável que contém orifícios para alimentação de inóculo, saída de amostra, entrada e saída de gás, dotado de controle de pH, temperatura, agitação e aeração, mostrado na Figura 3.6.

Figura 3.6 - Fermentador do tipo Biostat® B utilizado na produção da β -galactosidase



Extração: A enzima β -galactosidase foi extraída utilizando um processador ultrassônico com frequência de 20 kHz e potência máxima de 150 W, dotado de uma micro ponteira de titânio (Mp) como mostrado na Figura 3.7.

Figura 3.7 - Processador Ultrassônico utilizado na extração da β -galactosidase



3.1.4.3 Unidade experimental para hidrólise da lactose em leito fixo

A hidrólise da lactose em leito fixo foi conduzida em uma coluna, com 70 mm de altura e 4,7 mm de diâmetro. Volume útil de 5,5 cm³. A alimentação foi realizada com uma bomba peristáltica da MasterFlex[®] modelo 7519-20. A unidade experimental é demonstrada na Figura 3.8.

Figura 3.8 - Unidade experimental para hidrólise da lactose em leito fixo



3.1.4.3 Unidade experimental para produção dos galacto-oligossacarídeos

A síntese dos GOS foi avaliada em diferentes formas. Utilizou inicialmente uma incubadora rotatória da Ethik Technology[®] - Modelo 430-RD, com agitação e temperatura controlada. Outra forma de produção foi em reator de mistura encamisado com agitação magnética, utilizando cestas de aço inox para colocar o biocatalisador imobilizado. As especificações dos reatores e a montagem da unidade experimental foi a mesma do item 3.1.4.1, demonstrado na Figura 3.5.

Também foi realizada a síntese dos GOS em reator de mistura encamisado com agitação mecânica. A unidade era composta por dois reatores de mistura que operaram em batelada. Os reatores apresentavam volume útil de 75 mL, com camisa externa para circulação de água proveniente de banho termostatzado para controle da temperatura. A agitação foi realizada através de agitadores tipo hélice da IKA[®] Modelo RW20 digital. A Figura 3.9 mostra a unidade experimental.

Figura 3.9 - Unidade experimental para síntese de GOS com agitação mecânica



Outra configuração de reator utilizado para a síntese dos GOS foi utilizando colunas do tipo leito fixo. Foram utilizadas duas colunas com dimensões diferentes. A primeira apresentava 70 mm de altura e 10 mm de diâmetro, com volume útil de 21,76 cm³. E a segunda possuía camisa dupla, com 145,5 mm de altura e 10,38 mm de diâmetro, o volume útil era 21,93 cm³. Para a alimentação foi utilizado em ambos os casos bomba peristáltica da MasterFlex[®] de modelo 7519-20. A alimentação permaneceu sob constante agitação magnética. E para segunda coluna utilizou um banho termostático que foi acoplado por meio de mangueiras para controle da temperatura. As unidades experimentais são ilustradas na Figura 3.10 (Coluna 1) e Figura 3.11 (Coluna 2).

Figura 3.10 - Unidade experimental para síntese de GOS em coluna de leito fixo, coluna 1.



Figura 3.11 - Unidade experimental para síntese de GOS em coluna de leito fixo, coluna 2.



3.2 METODOLOGIA

3.2.1 Determinação da atividade enzimática

Para determinar a atividade enzimática da enzima β -galactosidase comercial e produzida, foi utilizado o método das taxas iniciais da reação de hidrólise da lactose tanto para as formas solúveis como imobilizadas. O processo foi conduzido em reator de mistura em operação batelada, utilizando um volume de 75 mL de solução 50 g.L⁻¹ de lactose (PA), preparado em tampão láctico pH 7,0, a 30 °C (SANTIAGO et al., 2004). Em cada experimento era adicionada ao reator 5 mL de solução enzimática comercial ou do extrato enzimático bruto obtido para determinar a atividade da enzima solúvel. Para a enzima imobilizada era adicionado uma cesta de aço inox contendo 0,1 g de enzima imobilizada.

A unidade de atividade (U) foi definida como μmol de glicose produzida por minuto ($\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$). Para cada experimento foram retiradas cinco amostras do meio reacional no intervalo de cinco em cinco minutos (5, 10, 15, 20 e 25 min). As amostras obtidas eram colocadas em tubos de ensaio, que eram tampados e colocados diretamente em banho de água em ebulição, por 10 minutos, para inativação da enzima. O método da glicose-oxidase foi utilizado para dosar a glicose formada, foi realizado utilizando o kit Glicose Liquiform da Labtest conforme Apêndice A (BAO et al., 2004).

A partir da inclinação das equações lineares de concentração de glicose em função do tempo, usando o método das taxas iniciais da reação de hidrólise da lactose era obtida a atividade enzimática (BAO et al., 2004). Os experimentos foram realizados em duplicata para maior confiabilidade dos resultados obtidos.

3.2.2 Produção da β -galactosidade de *K. marxianus*

3.2.2.1 Fermentação

A fermentação foi conduzida em condições controladas de temperatura a 30 °C, agitação de 300 rpm, aeração 1 vvm (vazão de gás por volume de meio) no tempo de 24 horas (FALLEIROS, 2016). A unidade experimental utilizada foi descrita no item 3.1.4.2, utilizando 1,5 L de volume útil do reator.

3.2.2.2 Extração da enzima

A extração foi realizada a partir de uma suspensão celular da levedura *K. marxianus* ATCC 46537. O caldo fermentado foi centrifugado em centrífuga da marca Beckman Coulter® modelo Avanti Centrifuge J-25 (27 200 g, 10 minutos). O decantado foi ressuspenso em tampão fosfato de potássio 0,05 M pH 7,0 para obter uma suspensão celular com 10,48 mg.mL⁻¹, condições baseadas no trabalho de Sousa et al. (2021).

Para extração foi utilizado rompimento em um processador ultrassônico (descrito no item 3.1.4.2) 20 kHz e potência máxima de 150 W, usando uma micro ponteira de titânio (Mp) a 40% de potência. A suspensão celular foi submetida a 30 minutos de pulsos ultrassônicos (tempo total do processo de 60 minutos), com substituição do banho de gelo a cada 10 minutos (LEMES et al., 2012).

Para obtenção do extrato enzimático clarificado, a suspensão celular obtida após cada processo de ruptura, foi centrifugada (27 200 g, 10 minutos) e o sobrenadante utilizado para determinar a atividade enzimática.

3.2.3 Determinação das concentrações de açúcares

As concentrações de açúcares foram determinadas por cromatografia líquida de alta eficiência. A amostra foi diluída, filtrada e injetada no sistema cromatográfico, HPLC (High Performance Liquid Chromatography- Cromatografia Líquida de Alta Performance), marca Shimadzu modelo LC-20A Prominence, coluna SUPELCOGEL Ca. A solução de arraste utilizada foi água deionizada, com fluxo de $0,5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, temperatura do forno a $80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e volume de injeção de $20 \text{ }\mu\text{L}$. As concentrações dos açúcares foram calculadas com auxílio de curvas padrão previamente realizadas. Os padrões utilizados foram: lactose, glicose, galactose (Sigma Aldrich Brasil) e um galacto-oligossacarídeo comercial com concentração de 90%, gentilmente cedido pela Nutramax – Life Science Products.

3.3 IMOBILIZAÇÃO DA β -GALACTOSIDASE EM SÍLICA

3.3.1 Preparação da sílica

Inicialmente foi avaliado o processo de funcionalização da sílica com o 3-Aminopropil-Trietoxissilano (APTES), que promove a silanização com organossilanos. Foi avaliado o processo em via aquosa e via orgânica. Após a funcionalização, a imobilização da enzima em cada uma das sílicas foi avaliada.

Funcionalização da sílica por via aquosa: Prepararam-se soluções aquosas de 3-Aminopropil-Trietoxissilano (APTES) a 0,5% (v.v⁻¹) e adicionou a solução ao suporte. Utilizou-se a relação de 10 mL de solução por grama de suporte. A mistura suporte e APTES permaneceram em banho termostático a $75 \text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 3 horas. Após, esse tempo, o material foi lavado com água destilada sob vácuo e deixou secar em $80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ (24 h) (WEETALL, 1976).

Funcionalização da sílica por via orgânica: Prepararam-se soluções de 3-Aminopropil-Trietoxissilano (APTES) a 1,0% em tolueno e adicionou a solução ao suporte. Utilizou-se a relação de 10 mL de solução por grama de suporte. A mistura suporte e APTES permaneceram em banho termostático a $75 \text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 3 horas, após o tempo de reação, o material foi lavado com água destilada sob vácuo e deixou secar em $100 \text{ }^{\circ}\text{C}$ (24 h) (WEETALL, 1976).

3.3.1.1 Ativação com glutaraldeído

Após a funcionalização da sílica, as amostras eram ativadas com o reticulante glutaraldeído. A solução de glutaraldeído foi preparada a 2,5% em tampão fosfato de sódio 0,2 M pH 7,0, utilizando a relação de 10 mL de solução por grama de suporte. A solução foi colocada em incubadora rotatória sob agitação (120 rpm) em 25 °C por 45 minutos (RIBEIRO, 1989).

3.3.2 Atividade recuperada na imobilização da β -galactosidase

Para todas as imobilizações foi calculada a atividade recuperada (AR) definida como uma razão entre a atividade observada na enzima imobilizada sobre a atividade da enzima solúvel inicial (Equação 3.1). Em alguns casos, foi calculado também a eficiência de imobilização, conforme a Equação 3.2. A unidade utilizada nos cálculos foi U ($\mu\text{mol de glicose} \cdot \text{min}^{-1}$) e em alguns casos $\text{U} \cdot \text{g}^{-1}$ de suporte, considerando que para todos os experimentos de imobilização foi utilizado uma massa de 0,1 g de sílica de porosidade controlada. A atividade recuperada mostrada na Equação 3.1, foi definida conforme Sheldon e Van Pelt. (2013).

$$AR(\%) = \frac{\text{atividade observada}}{\text{atividade inicial da enzima solúvel}} \times 100 \quad (3.1)$$

$$\text{Eficiência de imobilização (\%)} = \frac{\text{atividade imobilizada observada}}{\text{atividade imobilizada (inicial-sobrenante)}} \quad (3.2)$$

3.4 TESTES PRELIMINARES DE IMOBILIZAÇÃO DA ENZIMA COMERCIAL LACTOZYME® 2600 L

O processo de imobilização consistiu na ligação covalente da enzima na sílica de porosidade controlada. Uma massa de 0,1 g da sílica de porosidade controlada, previamente funcionalizada e ativada foi incubada em 15 mL de solução enzimática com concentração de 0,1% preparada em tampão láctico pH 7,0 (pH ótimo da enzima β -galactosidase de *K. lactis*). As amostras foram mantidas sob agitação de 120 rpm em incubadora rotatória a $20 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$ por tempo determinado em cada análise (RIBEIRO, 1989; SOUSA, et al., 2021).

3.4.1 Avaliação do tempo de imobilização da β -galactosidase

A β -galactosidase foi imobilizada em sílica de porosidade controlada conforme o item 3.4 em diferentes tempos de imobilização. A sílica utilizada foi silanizada em via aquosa, definida como a melhor condição e previamente ativada com glutaraldeído. Os tempos avaliados foram de 0,5; 1; 2; 4; 6; 12; 24; 36 e 48 horas. Ao final das imobilizações foram avaliadas as atividades enzimáticas (item 3.2.1) e as atividades recuperadas (item 3.3.2).

3.5 AVALIAÇÃO DAS MELHORES CONDIÇÕES DE IMOBILIZAÇÃO DA β -GALACTOSIDASE COMERCIAL EM SÍLICA DE POROSIDADE CONTROLADA

Para análise da imobilização da β -galactosidase de *K. lactis* (Lactozyme® 2600 L) foi estudada a influência de três variáveis, selecionadas a partir dos experimentos preliminares e resultados da literatura, por um Planejamento Composto Central (PCC). Essas variáveis foram: concentração do APTES utilizado na funcionalização da sílica; concentração enzimática no meio de imobilização e concentração do glutaraldeído utilizado na ativação da sílica funcionalizada. Como respostas para a atividade da enzima imobilizada, atividade recuperada (Equação 3.1) e eficiência (Equação 3.2) do biocatalisador imobilizado.

O PCC foi realizado com dois níveis originais, usando o software *Statistica*® 7.0, tendo 2^3 pontos fatoriais, 6 pontos axiais e 3 repetições no ponto central, totalizando dezessete experimentos.

A concentração do APTES utilizado na funcionalização da sílica variou entre 0,16 e 1,84%, a concentração enzimática variou de 0,26 a 28,60 U.mL_{extrato enzimático}⁻¹ e a concentração do glutaraldeído utilizado na ativação da sílica funcionalizada variou de 0,14 a 6,86%. O alfa de rotabilidade utilizado neste planejamento experimental foi de 1,68.

Os níveis das variáveis estudadas foram colocados na forma codificada (adimensionalizada), usando a equação geral de codificação (Equação 3.3). As equações codificadas para concentração do APTES (X_1), atividade inicial ofertada (X_2) e concentração de glutaraldeído (X_3) são mostradas nas Equações 3.4; 3.5; 3.6, respectivamente.

$$X_n = \frac{(X - X_0)}{\frac{X_{+1} - X_{-1}}{2}} \quad (3.3)$$

Sendo:

X_n o valor da variável no experimento na forma codificada; X é o valor real da variável a ser calculada; X_0 é o valor real da variável no ponto central; X_{+1} é o valor real da variável no nível superior; X_{-1} é o valor real da variável no nível inferior.

$$X_1 = \frac{([Concentração\ de\ APTES]-1,0)}{0,5} \quad (3.4)$$

$$X_2 = \frac{([Atividade\ Inicial\ Ofertada]-15,60)}{7,8} \quad (3.5)$$

$$X_3 = \frac{([Concentração\ do\ glutaraldeído]-3,5)}{2} \quad (3.6)$$

Na Tabela 3.5 podem ser vistos os valores que foram utilizados no planejamento experimental para as três variáveis independentes analisadas.

Tabela 3.5 - Valores reais e codificados utilizados no Planejamento Composto Central

Valores Codificados	Concentração de APTES (%) (X_1)	Atividade Inicial Ofertada (U.mL⁻¹ extrato enzimático) (X_2)	Concentração de Glutaraldeído (%) (X_3)
$-\alpha$	0,16	0,26	0,14
-1	0,50	7,80	1,50
0	1,00	15,60	3,50
1	1,50	23,40	5,50
$+\alpha$	1,84	28,60	6,86

A Tabela 3.6 mostra a matriz do PCC com os valores codificados e originais das variáveis estudadas. Os ensaios foram realizados de forma aleatória, com intuito de evitar a tendenciosidade dos resultados. As faixas iniciais adotadas na otimização foram determinadas segundo informações da literatura (RIBEIRO et al., 2018; SOUSA et al., 2021).

Os resultados obtidos foram avaliados utilizando o *Statistica*® 7.0. A análise de desejabilidade foi realizada para determinação do ponto ótimo. Para avaliar a conformidade do obtido experimentalmente com o previsto pelo modelo foi feita uma validação com o ponto otimizado em triplicata.

Tabela 3.6 - Matriz do PCC com os valores codificados e originais das variáveis

<i>Experimento</i>	<i>Concentração de APTES (%)</i>	<i>Atividade Inicial Ofertada (U.mL⁻¹ extrato enzimático)</i>	<i>Concentração de Glutaraldeído (%)</i>
1	0,50 (-1)	7,80 (-1)	1,50 (-1)
2	0,50 (-1)	23,40 (1)	5,50 (1)
3	1,50 (1)	7,80 (-1)	5,50 (1)
4	1,50 (1)	23,40 (1)	1,50 (-1)
5	1,00 (0)	15,60 (0)	3,50 (0)
6	0,50 (-1)	7,80 (-1)	5,50 (1)
7	0,50 (-1)	23,40 (1)	1,50 (-1)
8	1,50 (1)	7,80 (-1)	1,50 (-1)
9	1,50 (1)	23,40 (1)	5,50 (1)
10	1,00 (0)	15,60 (0)	3,50 (0)
11	0,16 (- α)	15,60 (0)	3,50 (0)
12	1,84 (+ α)	15,60 (0)	3,50 (0)
13	1,00 (0)	0,26 (- α)	3,50 (0)
14	1,00 (0)	28,60 (+ α)	3,50 (0)
15	1,00 (0)	15,60 (0)	0,14 (- α)
16	1,00 (0)	15,60 (0)	6,86 (+ α)
17	1,00 (0)	15,60 (0)	3,50 (0)

3.6 REAVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE APTES NA IMOBILIZAÇÃO DA β -GALACTOSIDASE COMERCIAL EM SÍLICA DE POROSIDADE CONTROLADA

Após a avaliação das melhores condições de imobilização da β -galactosidase, optou-se por reavaliar a concentração de APTES, visto que, este apresenta um alto valor agregado. A condição definida anteriormente foi uma concentração de APTES a 1,0% no processo de imobilização. Assim, reduziu essa quantidade para 0,6%, mantendo os outros parâmetros iguais e comparou-se com os resultados obtidos da imobilização com 1,0% APTES. Aplicou o teste de t de Student, para avaliar a diferença entre médias.

3.7 CARACTERIZAÇÃO DA β -GALACTOSIDASE COMERCIAL IMOBILIZADA EM SÍLICA

Com as melhores condições definidas para o processo de imobilização (item 3.5 e 3.6) o biocatalisador imobilizado foi avaliado quanto a diferentes características.

Em todas as análises de caracterização do biocatalisador imobilizado a atividade residual foi calculada em relação à atividade inicial do biocatalisador imobilizado. Os resultados obtidos são uma média dos experimentos independentes conduzidos em duplicata. Os resultados das análises foram plotados usando o software *Origin® Pro* 2018.

3.7.1 Influência do pH e da temperatura na atividade da enzima imobilizada

A influência do pH e da temperatura na atividade do biocatalisador imobilizado foi analisada na hidrólise enzimática da lactose. A solução de lactose 50 g.L⁻¹ foi preparada em tampão fosfato de potássio 0,1 M em diferentes valores de pH (5,6; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5 e 8,0), nesta etapa a temperatura foi fixa em 30 °C. Para avaliação da temperatura, a hidrólise da lactose foi conduzida conforme o item (3.2.1) em diferentes temperaturas (20; 30; 35; 40; 45; 50; 55 °C) A atividade enzimática inicial do biocatalisador imobilizado foi determinada conforme o item 3.2.1.

3.7.2 Estabilidade ao pH da enzima imobilizada

Para avaliação da estabilidade em relação ao pH o biocatalisador imobilizado foi incubado em tampão fosfato de potássio 0,1 M em diferentes valores de pH (5,6; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5 e 8,0). As amostras foram mantidas em 15 mL de tampão durante 6 horas à 30 °C. A atividade enzimática (item 3.2.1) foi determinada antes e após a incubação.

3.7.3 Estabilidade térmica da enzima imobilizada

A enzima imobilizada em sílica foi incubada em banho termostático, em tampão láctico pH 7,0 a diferentes temperaturas e tempos, sendo eles: 20 °C (14 horas), 30 °C (6 horas), 40 °C (2 horas) e 45 °C (2 horas). Foram realizados os ajustes por meio dos modelos de desativação térmica de primeira ordem (Equação 3.7) e por modelagem de desativação térmica com um

estágio (Equação 3.8), utilizando a atividade residual em função do tempo de incubação para cada temperatura. Os ajustes foram realizados pelo método numérico Levenberg-Marquardt usando o software *Statistica*® 7.0, determinando os parâmetros cinéticos por meio dos melhores ajustes (HENLEY; SADANA, 1985).

$$\frac{A}{A_0} = e^{(-k_d \cdot t)} \quad (3.7)$$

$$\frac{A}{A_0} = (1 - \alpha_1) \cdot e^{(-k_d \cdot t)} + \alpha_1 \quad (3.8)$$

Sendo:

$$\frac{A}{A_0} = \text{Atividade Relativa}$$

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

k_d = constante cinética de desativação térmica (h^{-1})

Para cada temperatura foram determinados os tempos de meia vida, sendo possível considerar o melhor ajuste dos dados experimentais às equações de desativação térmica para cada temperatura (3.7 e 3.8) utilizando as Equações 3.9 e 3.10, para os modelos de desativação térmica e desativação térmica com um estágio, respectivamente. A energia de ativação da desativação térmica foi calculada pela equação de Arrhenius linearizada (Equação 3.11).

$$t_{\frac{1}{2}} = -\frac{\ln(0,5)}{k_d} \quad (3.9)$$

$$t_{\frac{1}{2}} = -\frac{1}{k_d} \ln \left(\frac{\frac{A}{A_0} - \alpha_1}{1 - \alpha_1} \right) \quad (3.10)$$

$$\ln(k_d) = \ln(A) - \frac{E_a}{R} \cdot \frac{1}{T} \quad (3.11)$$

A = fator de frequência para a reação

E_a = energia de ativação do processo de desativação térmica

T = temperatura absoluta

R = constante da lei dos gases

3.7.4 Parâmetros termodinâmicos relativos à ativação e desativação térmica

Os parâmetros termodinâmicos foram estimados, considerando o valor da energia de ativação do processo de desativação térmica (E_a) obtido na estabilidade térmica. A entalpia de inativação foi calculada conforme a Equação 3.12, sendo R a constante universal dos gases $8,314 \text{ J mol}^{-1}$ e T a temperatura absoluta em Kelvin.

$$\Delta H = E_a - RT \quad (3.12)$$

A energia livre de Gibbs da inativação (ΔG) e a entropia de ativação (ΔS) foram calculadas a partir das Equações 3.13 e 3.14, respectivamente.

$$\Delta G = -RT \times \ln \frac{k_d \times h_p}{K_B \times T} \quad (3.13)$$

$$\Delta S = \frac{\Delta H - \Delta G}{T} \quad (3.14)$$

Sendo, K_B a constante de Boltzmann ($1,38 \cdot 10^{-23} \text{ J.K}^{-1}$), h_p a constante de Planck ($6,626 \cdot 10^{-34} \text{ J}$), k_d é a constante de desativação térmica e T a temperatura absoluta.

3.7.5 Reutilização da enzima imobilizada

Foi avaliada a possibilidade de reutilização da β -galactosidase imobilizada, utilizando-a em cinco ciclos consecutivos de hidrólise da lactose de 25 minutos cada. A hidrólise foi realizada conforme descrito no item 3.2.1. Entre duas etapas de hidrólise, o biocatalisador foi lavado com 50 mL de tampão láctico pH 7,0, para remover qualquer resíduo do processo anterior.

3.7.6 Estabilidade ao armazenamento da enzima imobilizada

A β -galactosidase imobilizada foi armazenada em 12 mL de tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,0 sob refrigeração a 8 °C. As amostras foram avaliadas durante 105 dias. Após as análises as enzimas foram lavadas e armazenadas novamente. A cada análise a atividade enzimática era determinada. A atividade inicial da enzima imobilizada antes do armazenamento foi considerada como 100%.

3.7.7 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR)

A espectroscopia de infravermelho foi realizada com intuito de identificar as ligações entre enzima e suporte. As amostras avaliadas foram a enzima β -galactosidase (Lactozyme® 2600 L), a sílica pura, a sílica funcionalizada com APTES, a sílica funcionalizada com APTES e ativada com glutaraldeído e sílica imobilizada com a β -galactosidase na condição ótima. Utilizou-se a faixa de 4000-500 cm^{-1} para a Espectroscopia FT-IR (Spectrum Two® - PerkinElmer).

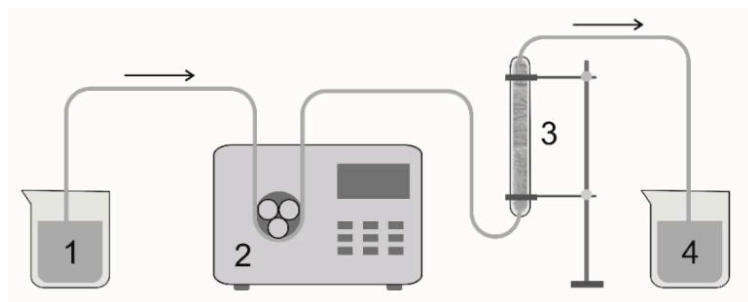
3.7.8 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

O Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV), Carl Zeiss, modelo EVO MA 10, espectroscopia dispersiva de energia foi utilizado para realizar a análise microestrutural da sílica mesoporosa. As amostras analisadas foram: sílica pura, sílica funcionalizada com APTES, sílica funcionalizada com APTES e ativada com glutaraldeído e sílica imobilizada com β -galactosidase.

3.8 HIDRÓLISE DA LACTOSE EM LEITO FIXO

A enzima empregada neste estudo foi imobilizada conforme item 3.5, nas seguintes condições: concentração de APTES: 0,6%; concentração enzimática: 21 U.mL^{-1} , concentração de glutaraldeído: 6,86% e aplicada para hidrólise em leito fixo operado em processo contínuo como é demonstrado na Figura 3.12.

Figura 3.12 - Esquema da unidade da hidrólise da lactose em reator de leito fixo. 1) Solução de alimentação; 2) Bomba peristáltica; 3) Reator com a enzima imobilizada; 4) Produto.



Fonte: A Autora

Foi utilizado um reator de leito fixo, com as seguintes dimensões: altura de 70 mm e diâmetro de 4,7 mm. O reator operou em regime contínuo com escoamento ascendente, utilizando solução de lactose 5 g.L⁻¹ e 50 g.L⁻¹ preparada em tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,0. O reator foi preenchido com 0,8 g de sílica imobilizada nas condições otimizadas. Os experimentos foram conduzidos em ambiente climatizado a cerca de 24 °C ± 1 °C. Uma bomba peristáltica foi utilizada para alimentar continuamente a solução de lactose, a vazão foi fixada em 0,097 mL.min⁻¹, amostras foram retiradas a cada 10 min até alcançar o regime estacionário. A glicose formada foi determinada pelo método Glicose-oxidase, posteriormente foi calculada a conversão da lactose (Equação 3.15).

$$\text{Conversão de lactose (\%)} = \frac{S_0 - S_f}{S_0} \times 100\% \quad (3.15)$$

Sendo, S_0 a concentração de substrato no tanque de alimentação e S_f a concentração de substrato na saída do sistema.

3.9 AVALIAÇÃO DA IMOBILIZAÇÃO DE β -GALACTOSIDASE PRODUZIDA POR FERMENTAÇÃO COM *Kluyveromyces marxianus*

Definidas as melhores condições para imobilização da β -galactosidase comercial de *K. lactis* (Lactozyme[®] 2600 L), iniciou-se a avaliação da imobilização da enzima produzida em sílica. A enzima foi produzida por fermentação submersa de *K. marxianus* e posteriormente extraída, de acordo com as metodologias citadas nos itens 3.2.2.1 e 3.2.2.2.

3.9.1 Imobilização do extrato enzimático bruto em sílica

A imobilização foi realizada com o extrato enzimático bruto obtido em 0,1 g de sílica previamente funcionalizada e ativada com glutaraldeído. As condições na imobilização foram as mesmas obtidas do processo de imobilização da enzima comercial Lactozyme® 2600 L, que foram: concentração de APTES 0,6%, atividade inicial da enzima ofertada em 21 U.mL⁻¹ e concentração de glutaraldeído em 6,86%. O procedimento de imobilização foi realizado em incubadora rotatória a 120 rpm, 20 °C, por 6 horas. Para ofertar a atividade inicial da enzima no valor correto, foi determinada a atividade enzimática inicial do extrato, ponderando o volume necessário. Também foram conduzidos experimentos utilizando as mesmas condições, porém aumentando a massa de sílica de 0,1 g para 0,5 g.

3.9.1.1 Imobilização em série

Foram feitas imobilizações seriadas, sendo realizadas três imobilizações consecutivas, utilizando a mesma solução enzimática (SOUZA et al., 2021). O processo em série tem o objetivo de reter impurezas nas primeiras etapas e assim contribuir para a imobilização da enzima. A imobilização foi realizada por 2 horas, 0,1 g de sílica previamente ativada, 120 rpm, 20 ± 1 °C e após a primeira imobilização a sílica foi separada do sobrenadante. O sobrenadante resultante da primeira imobilização foi novamente ofertado à uma nova massa de sílica (0,1 g). A segunda imobilização foi realizada nas mesmas condições, e posteriormente realizou o mesmo para a terceira imobilização. As sílicas de cada uma das etapas foram lavadas separadamente com tampão láctico pH 7,0 e foi determinada a atividade enzimática.

3.10 AVALIAÇÃO DA PURIFICAÇÃO PARCIAL DA β -GALACTOSIDASE PRODUZIDA POR *Kluyveromyces marxianus*

O extrato enzimático bruto pode conter outras impurezas além da enzima, dessa forma optou-se por avaliar algumas técnicas de purificação parcial, com intuito de realizar uma limpeza no extrato bruto. Desejando obter resultados mais expressivos nas imobilizações, em termos de atividades enzimáticas.

3.10.1 Avaliação da ligação do extrato bruto enzimático em Duolite A-568 em leito fixo como estratégia de purificação parcial

Foi utilizado uma coluna tipo leito fixo, de volume útil de 21,93 mL, com as dimensões 14,55 cm de altura e 1,38 cm de diâmetro. A vazão de alimentação da coluna foi controlada com auxílio de bomba peristáltica de cabeçote duplo com fluxo ascendente. Utilizou 7,763 g de resina Duolite A-568 previamente ativada, conforme Sousa et al. (2021). A vazão fixada foi 0,5 mL.min⁻¹, o extrato enzimático foi preparado em tampão fosfato de potássio pH 6,0, o volume inicial de extrato enzimático alimentado na coluna foi de 36 mL.

A solução coletada na saída do reator teve sua atividade enzimática determinada e foi utilizada posteriormente para imobilização em sílica, nas condições definidas no item 3.5. A resina Duolite A-568 foi retirada do reator e colocada em repouso em tampão fosfato de potássio pH 7,3 e depois em pH 5,6 por 12 horas, foi analisada a dessorção da enzima β -galactosidase.

3.10.2 Diálise do extrato bruto enzimático

Outra técnica avaliada foi a utilização de membrana de diálise. Aplicando tubo de diálise Servapor[®] (MWCO 1200-1400) de 16 mm de diâmetro, a membrana foi previamente hidratada. A hidratação foi realizada sob aquecimento da membrana imersa em 800 mL de água deionizada, utilizando-se banho termostático à 75 °C $\pm$ 1 °C, por 2 horas e repetido por 3 vezes. Após hidratação as membranas foram armazenadas em 150 mL de água deionizada com 3,0 g.L⁻¹ de ázida de sódio como agente anti bacteriológico, até sua utilização.

Para purificação, o extrato enzimático bruto com sua atividade enzimática determinada foi colocado no tubo de diálise Servapor[®] hidratado. Foram colocados cerca de 30 mL de extrato enzimático, a membrana com o extrato foi imersa em 900 mL de tampão fosfato de potássio 25 mM, sob agitação magnética em temperatura de $\pm$ 8 °C, o processo foi de 2 horas, sendo o tampão substituído após 1 hora. Após a diálise, a atividade enzimática foi determinada e realizado o processo de imobilização em sílica de acordo com as condições otimizadas no item 3.5.

Foi realizada imobilização direta com extrato enzimático dialisado e também com o extrato liofilizado. A solução enzimática dialisada foi liofilizada em Liofilizador Liotop[®] L101 por 24 horas, com intuito de aumentar sua concentração. Após a liofilização o extrato

enzimático foi ressuspenso em 8 mL de tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,0. Ao final de cada etapa as atividades enzimáticas foram determinadas.

3.10.3 Precipitação com sal seguida de diálise

Avaliou a precipitação com sal, seguida de diálise para o tratamento do extrato enzimático bruto de β -galactosidase. A solução do extrato enzimático foi preparada com o sulfato de amônio até 70% de saturação. Sob agitação magnética por pelo menos 15 min, o sal foi adicionado. Após este tempo a solução salina foi mantida a uma temperatura de 8 °C por 12 h. Em seguida, o precipitado obtido foi ressuspenso em tampão fosfato de potássio (50 mM) com $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (0,1 mM), sendo então a solução dialisada conforme descrito no item 3.10.2. As amostras obtidas foram direcionadas para imobilização em sílica, sendo parte para imobilização direta e outra liofilizada em Liofilizador Liotop® L101 por 24 horas, para posterior imobilização em sílica. Após cada etapa foi avaliada a atividade enzimática.

3.10.4 Utilização das resinas AMBERLITE XAD761® e AMBERJET™ 4200 Cl como estratégias de purificação parcial do extrato bruto enzimático

AMBERLITE XAD761®: É uma resina fenólica granular, comercializada pela Rohm and Haas Company. Para sua ativação utilizou metanol, na proporção de 2 mL por grama de resina. Sob agitação magnética a solução foi mantida por 30 minutos, esse procedimento foi repetido três vezes. Ao final do processo, separou a resina em filtro a vácuo, lavando com água destilada, a resina foi seca a 37 °C por 48 horas. Antes da utilização da resina ativada era necessário hidratar a mesma, com 100 mL de etanol, seguida de lavagem com água destilada em filtro à vácuo. A adsorção foi realizada com 0,5 g de resina e 35 mL de extrato enzimático preparado em tampão fosfato de potássio 0,05 M pH 7,0, em incubadora rotatória em 20 °C, 120 rpm por 2 horas e ao final foi determinada a atividade enzimática da resina imobilizada.

AMBERJET™ 4200 Cl: É uma resina aniônica fortemente básica, comercializada pela Rohm and Haas Company. Para ativar a resina utilizou-se solução de NaOH 5% (m.v⁻¹), na relação de 10 g de resina para 100 mL de solução, deixou sob agitação por 30 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente foi lavada com água destilada acidificada com ácido clorídrico 0,1 M até pH 6,0, em filtro a vácuo, depois a resina foi seca à 37 °C por 24 horas. O processo de adsorção foi realizado com 0,5 g de resina e 20 mL de extrato enzimático preparado

em tampão fosfato de potássio pH 7,0, em incubadora rotatória a 20 °C, 120 rpm por 2 horas e ao final foi determinada a atividade enzimática da resina imobilizada.

Os sobrenadantes resultantes dos dois processos de adsorção foram utilizados para avaliar a imobilização em sílica mesoporosa, nas condições definidas no item 3.5.

3.10.5 Avaliação da Toyopearl® DEAE-650s como estratégia de purificação parcial do extrato enzimático bruto

A resina Toyopearl® DEAE 650s é um trocador aniônico fraco, comercializado em solução etanólica 20% (v.v⁻¹) pela Tosoh Bioscience. A ligação da enzima e suporte foi feita com 0,2 g de resina e 10 mL de extrato enzimático bruto preparado em tampão fosfato de potássio 0,05 M pH 7,0, em incubadora rotatória à 120 rpm e 20 °C por 2 horas. Após esse tempo, a resina foi separada do sobrenadante em filtro a vácuo. A atividade enzimática da resina imobilizada foi determinada conforme descrito no item 3.2.2 e utilizou cesta de aço inoxidável como apoio para o papel filtro contendo a resina imobilizada. Depois, lavou o suporte com tampão fosfato de potássio no filtro a vácuo e seguiu para etapa de dessorção.

Para dessorção da β-galactosidase parcialmente purificada, a resina imobilizada foi colocada em uma solução de cloreto de potássio 0,1 M em incubadora rotatória, 100 rpm, 20°C por 1 hora. Ao final, separou a resina da solução em filtro a vácuo. A solução enzimática recuperada da dessorção foi direcionada para diálise, o processo foi conduzido como descrito no item 3.10.2 utilizando tampão fosfato de potássio 0,01 M, pH 7,0.

Após a diálise foi determinada a atividade enzimática da solução recuperada e também foi feita a imobilização em sílica, nas condições definidas no item 3.5.

3.11 SÍNTESE DOS GALACTO-OLIGOSSACARÍDEOS

Os galacto-oligossacarídeos foram produzidos utilizando a enzima β-galactosidase comercial (Lactozyme® 2600 L) em ambas as formas, livre e imobilizada. Para todos os processos de síntese dos galacto-oligossacarídeos foram calculados o rendimento de produção R_{GOS} (%), conforme a Equação 3.16 e a conversão de lactose, Equação 3.15.

$$R_{GOS}(\%) = \frac{c_{GOS}(g.L^{-1})}{c_{açúcar\ total}(g.L^{-1})} \times 100\% \quad (3.16)$$

3.11.1 Testes preliminares

Foram definidas as condições de produção, de acordo com a literatura e as faixas de operação da β -galactosidase estudada (LISBOA et al., 2012; FISCHER; KLEINSCHMIDT, 2021; SOUSA et al., 2021). As reações de síntese enzimática dos GOS foram conduzidas em incubadora rotatória a 150 rpm. A solução reacional era composta por lactose, tampão fosfato de potássio 0,05 M, pH 7,0 e enzima, em volume total de 20 mL, sendo adicionadas em erlenmeyer de 25 mL. A concentração de lactose utilizada foi definida em cada teste. Em intervalos definidos de tempo eram retiradas amostras de 0,5 mL, que eram incubadas em banho em ebulição por 10 minutos, com o objetivo de interromper a reação. Posteriormente as amostras foram diluídas, filtradas e realizou-se a quantificação dos carboidratos, conforme metodologia descrita no item 3.2.3.

3.11.1.1 Síntese dos galacto-oligossacarídeos com a enzima comercial (Lactozyme® 2600 L) livre e imobilizada

A produção dos galacto-oligossacarídeos com a enzima livre foi avaliada utilizando uma concentração enzimática de 21 U.mL⁻¹, mesma concentração definida na otimização do processo de imobilização em sílica (3.5). Foi avaliada a síntese de GOS em concentração de lactose de 200 e 400 g.L⁻¹ no tempo de 3 horas, em 30 °C. A quantificação de GOS e demais açúcares foram avaliados com as curvas padrões, definidas previamente.

Com a enzima imobilizada, conduziu-se o processo de imobilização nas mesmas condições definidas na otimização, ao final do processo, separou-se a sílica imobilizada do sobrenadante restante, deixou à temperatura de 24 °C $\pm$ 1 °C por aproximadamente 30 minutos, para reduzir a umidade, pesou a quantidade de 0,1 g de biocatalisador imobilizado para cada reação, que tem sua atividade enzimática previamente determinada. A sílica imobilizada foi adicionada à solução reacional com concentração de lactose definida para cada experimento (200 e 300 g.L⁻¹). As condições avaliadas foram tempos de 6 horas e temperatura a 30 °C.

3.11.1.2 Influência da força iônica do tampão na síntese dos galacto oligossacarídeos com a enzima comercial (Lactozyme® 2600 L) livre e imobilizada

Para avaliar a influência da força do tampão na reação de transgalactosilação da β -galactosidase para produção dos galacto-oligossacarídeos utilizou-se a enzima livre com concentração de 21 U.mL⁻¹ e a enzima imobilizada nas condições previamente determinadas no item 3.5.

Para a enzima livre foi avaliada a força iônica do tampão fosfato de potássio em 0,05 M e 0,1 M, as reações foram conduzidas a 30 °C, 150 rpm, concentração de lactose de 300 g.L⁻¹ durante 6 horas. Para enzima imobilizada foi avaliada a força iônica do tampão fosfato de potássio em 0,05 M, 0,1 M e 0,2 M nas condições de 30 °C, 150 rpm, concentração de lactose de 300 g.L⁻¹ durante 8 horas.

3.12 INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE LACTOSE, AGITAÇÃO E TEMPERATURA NA PRODUÇÃO DE GALACTO-OLIGOSSACARÍDEOS COM β -GALACTOSIDASE COMERCIAL IMOBILIZADA EM SÍLICA

Para produção dos galacto-oligossacarídeos utilizou-se a β -galactosidase de *K. lactis* (Lactozyme® 2600 L) imobilizada em sílica de porosidade controlada conforme condições otimizadas no item 3.5. Os efeitos das variáveis: concentração de lactose, agitação e temperatura foram avaliados simultaneamente para síntese dos galacto-oligossacarídeos por meio de um Planejamento Fatorial Fracionário 2⁴⁻¹, com a adição de três ensaios no ponto central, totalizando 11 experimentos. As faixas das variáveis estudadas são apresentadas na Tabela 3.7 e foram selecionadas de acordo com os testes preliminares e informações da literatura (LISBOA et al., 2012; FISCHER; KLEINSCHMIDT, 2021; SOUSA et al., 2021). A matriz completa do planejamento é apresentada na Tabela 3.8.

Tabela 3.7 - Valores reais e codificados avaliados no Planejamento Fatorial Fracionário

Valores codificados	Concentração de Lactose (g.L ⁻¹)	Agitação (rpm)	Temperatura (°C)
-1	200	116	30
0	300	140	35
1	400	164	40

Tabela 3.8 - Matriz do Planejamento Fatorial Fracionário com os valores originais e codificados das variáveis

Experimento	Concentração de Lactose (g.L ⁻¹)	Agitação (rpm)	Temperatura (°C)
1	200,00 (-1)	116,00 (-1)	30,00 (-1)
2	200,00 (-1)	116,00 (-1)	40,00 (1)
3	200,00 (-1)	164,00 (1)	30,00 (-1)
4	200,00 (-1)	164,00 (1)	40,00 (1)
5	400,00 (1)	116,00 (-1)	30,00 (-1)
6	400,00 (1)	116,00 (-1)	40,00 (1)
7	400,00 (1)	164,00 (1)	30,00 (-1)
8	400,00 (1)	164,00 (1)	40,00 (1)
9	300,00 (0)	140,00 (0)	35,00 (0)
10	300,00 (0)	140,00 (0)	35,00 (0)
11	300,00 (0)	140,00 (0)	35,00 (0)

3.13 SÍNTESE DE GALACTO-OLIGOSSACARÍDEOS COM A ENZIMA COMERCIAL UTILIZANDO AGITAÇÃO MAGNÉTICA E MECÂNICA

Com intuito de diversificar a síntese de GOS, foram avaliadas também a agitação magnética e mecânica. Para produção utilizou os melhores parâmetros de temperatura e concentração inicial de lactose definidos no item 3.12. As condições para agitação foram aumentadas de acordo com a possibilidade funcional dos equipamentos.

A síntese de GOS foi realizada com a β -galactosidase comercial de *K. lactis* (Lactozyme® 2600 L) imobilizada em sílica conforme o item 3.5.

3.13.1 Agitação magnética na síntese de galacto-oligossacarídeos

Em reator de mistura, em operação batelada, a produção de GOS foi conduzida, utilizando um volume de 60 mL de solução de lactose a 400 g.L⁻¹, preparada em tampão fosfato de potássio 0,05 M, pH 7,0 em 40 °C, por 8 horas. Uma massa de 0,3 g de biocatalisador imobilizado foi utilizado e acondicionado em cesta de tela de aço inoxidável de 100 mesh, que

foi inserido no reator de mistura. As cestas evitaram o atrito entre as partículas de enzimas imobilizadas e o agitador (Figura 3.5). A agitação magnética utilizada foi de aproximadamente 200 rpm.

Amostras de 0,5 mL foram coletadas a cada 2 horas. E colocadas em um banho em ebulição por 10 minutos, visando a interrupção da reação. Em seguida as amostras foram diluídas, filtradas e realizou-se a quantificação dos carboidratos, segundo o item 3.2.3.

3.13.2 Agitação mecânica na síntese de galacto-oligossacarídeos

O processo foi realizado em agitadores do tipo hélice IKA® RW 20 Digital e reatores de mistura encamisado do tipo batelada acoplados a um banho termostático, como ilustrado na Figura 3.9.

No reator de mistura utilizou um volume de 60 mL de solução de lactose a 400 g.L⁻¹, preparada em tampão fosfato de potássio 0,05 M pH 7,0. Uma massa de 0,3 g de biocatalisador imobilizado foi adicionada e as condições da reação foram 40 °C no tempo de 8 horas. A agitação foi avaliada a 400 e 600 rpm. A cada 2 horas foram retiradas amostras de 0,5 mL e colocadas em um banho em ebulição por 10 minutos, para cessar a reação. Ao final, as amostras foram diluídas, filtradas e realizou a quantificação dos carboidratos, segundo o item 3.2.3.

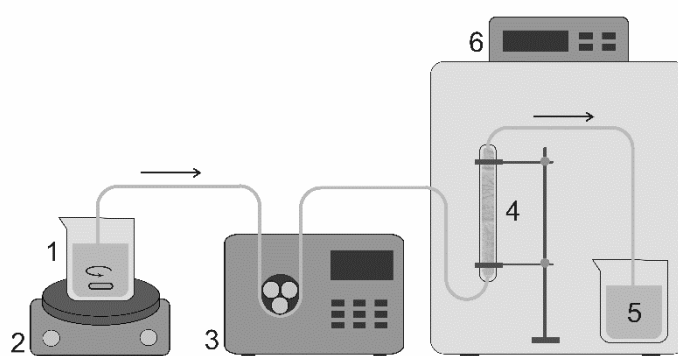
3.14 SÍNTESE DE GALACTO-OLIGOSSACARÍDEOS EM REATOR TIPO LEITO FIXO UTILIZANDO A β -GALACTOSIDASE COMERCIAL IMOBILIZADA EM SÍLICA

Um reator tipo leito fixo foi utilizado para avaliar a síntese dos GOS. Ele apresentava altura de 70 mm e diâmetro de 10 mm. O reator operou em regime contínuo com escoamento ascendente, como ilustrado na Figura 3.13. Uma massa de 2 g de sílica foi imobilizada com β -galactosidase comercial, conforme o item 3.5. O empacotamento do leito foi feito com 1,9 g de biocatalisador imobilizado, sendo que 0,1 g desse biocatalisador foi direcionado para determinação da atividade enzimática (item 3.2.1).

Os experimentos foram conduzidos em temperatura de 40 °C utilizando solução de lactose 400 g.L⁻¹ preparada em tampão fosfato de potássio 0,05 M, pH 7,0. Uma bomba peristáltica foi utilizada para alimentar continuamente a solução de lactose, a vazão foi fixada em 0,100 mL.min⁻¹. A solução de alimentação de lactose permaneceu sob agitação magnética

durante toda a reação (300 minutos) e aquecida a 40 °C. Amostras foram retiradas em tempos definidos e colocadas em um banho em ebulição por 10 minutos, para cessar a reação. Essas amostras foram diluídas, filtradas e realizou a quantificação dos carboidratos, segundo o item 3.2.3. Foram calculados o rendimento de GOS e conversão de lactose (Equação 3.16 e 3.15).

Figura 3.13 - Esquema da unidade de síntese de GOS em reator de leito fixo 1) Solução de alimentação; 2) Agitador magnético; 3) Bomba peristáltica; 4) Coluna empacotada com biocatalisador imobilizado; 5) Produto; 6) Incubadora com temperatura controlada



Fonte: A Autora

3.14.1 Leito fixo empacotado com β -galactosidase comercial imobilizada em sílica associada com esferas de vidro na síntese dos galacto-oligossacarídeos

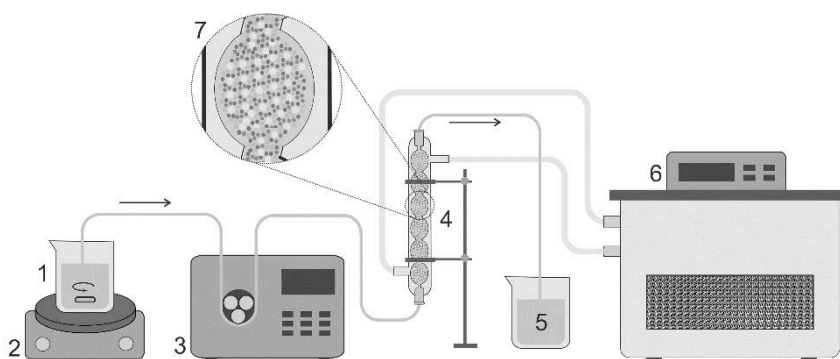
Com o objetivo de melhorar a síntese dos GOS em leito fixo, utilizou uma coluna com dimensões maiores, para aumentar o tempo de residência. A coluna apresentava volume útil de 21,93 mL, com 14,55 cm de altura e 1,38 cm de diâmetro. O reator operou em regime contínuo com escoamento ascendente. Uma bomba peristáltica foi utilizada para alimentar a solução de lactose, que permaneceu sob agitação magnética durante todo o processo. A Figura 3.14 apresenta o esquema do processo.

Para o empacotamento do leito utilizou uma razão de massa de biocatalisador imobilizado (M_B) por massa de inerte (M_I), essa razão foi de 1/8 g.g⁻¹ (GUERRERO et al., 2019). Esferas de vidro de 2 mm, previamente lavadas com água deionizada foram adotadas como material inerte. O biocatalisador foi imobilizado conforme o item 3.5.

O processo foi conduzido a 40 °C, utilizando como alimentação solução de lactose 400 g.L⁻¹ preparada em tampão fosfato de potássio 0,05 M, pH 7,0. Amostras foram coletadas em

tempos definidos e direcionadas para um banho em ebulição por 10 minutos, para interromper a reação enzimática. Essas amostras foram diluídas, filtradas e realizou a quantificação dos carboidratos, segundo o item 3.2.3. Foram calculados o rendimento de GOS e conversão de lactose (Equação 3.16 e 3.15).

Figura 3.14 - Esquema da unidade de síntese de GOS em reator de leito fixo 1) Solução de alimentação; 2) Agitador magnético; 3) Bomba peristáltica; 4) Coluna empacotada com biocatalisador imobilizado e esferas de vidro; 5) Produto; 6) Banho termostático; 7) Recheio da coluna sílica (em cinza) e esferas de vidro (em branco)



Fonte: A Autora

3.15 SÍNTESE DE GALACTO-OLIGOSSACARÍDEOS COM A β -GALACTOSIDASE PRODUZIDA POR *K. marxianus* NA SUA FORMA LIVRE E IMOBILIZADA EM SÍLICA

Com a β -galactosidase produzida por *K. marxianus* (item 3.2.2) avaliou a síntese de GOS. A enzima produzida foi utilizada em sua forma livre e imobilizada em sílica de porosidade controlada segundo o item 3.5. O processo foi realizado com agitadores do tipo hélice (IKA® RW 20 Digital) e reatores de mistura encamisado do tipo batelada (Figura 3.9). Utilizou um volume total de 60 mL no reator.

3.15.1 Enzima produzida por *K. marxianus* na forma livre

O extrato bruto enzimático produzido (item 3.2.2) foi concentrado por liofilização em liofilizador Liotop® L101 e sua atividade enzimática foi previamente determinada. No reator de mistura foi colocado 15 mL do extrato bruto enzimático liofilizado (hidratado em tampão

fosfato de potássio 0,05 M pH 7,0) em 45 mL de solução de lactose a 400 g.L⁻¹ preparada em tampão fosfato de potássio 0,05 M pH 7,0. As reações foram conduzidas a 40 °C, 400 rpm em 8 horas. Em tempos determinados foram retiradas amostras de 0,5 mL que foram para um banho em ebulição por 10 minutos, para interromper a reação enzimática. Ao final, as amostras foram diluídas, filtradas e realizou a quantificação dos carboidratos, segundo o item 3.2.3.

3.15.2 Enzima produzida por *K. marxianus* imobilizada em sílica de porosidade controlada

A imobilização em sílica foi realizada com o extrato bruto enzimático produzido (item 3.2.2) concentrado por liofilização em liofilizador Liotop® L101. A enzima foi imobilizada seguindo as condições do item 3.5. Adicionou o biocatalisador imobilizado no reator de mistura e acrescentou 60 mL de solução de lactose a 400 g.L⁻¹ preparada em tampão fosfato de potássio 0,05 M, pH 7,0. As reações foram conduzidas a 40 °C, 400 rpm em 8 horas. A cada 2 horas foram retiradas amostras de 0,5 mL que foram colocadas em banho em ebulição por 10 minutos, para interromper a reação. Ao final, as amostras foram diluídas, filtradas e realizou a quantificação dos carboidratos, segundo o item 3.2.3.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo serão apresentados e discutidos os principais resultados obtidos no desenvolvimento deste trabalho. Primeiramente serão apresentados os resultados da imobilização da β -galactosidase comercial Lactozyme® 2600 L em sílica de porosidade controlada. Em seguida a enzima imobilizada foi caracterizada quanto à influência do pH na atividade enzimática, a estabilidade térmica, estabilidade ao pH, reutilização e estabilidade ao armazenamento. Também serão apresentados resultados da espectroscopia de infravermelho e imagens da microscopia eletrônica de varredura. Dando continuidade, serão apresentados os resultados da imobilização da enzima produzida por *K. marxianus* nas condições otimizadas. E com o intuito de melhorar a imobilização foi feita a purificação da enzima de *K. marxianus* e seus resultados são apresentados. Por fim são apresentados os resultados referentes a produção dos GOS, testes preliminares e otimização.

4.1 IMOBILIZAÇÃO DA β -GALACTOSIDASE COMERCIAL EM SÍLICA

A funcionalização da sílica é o processo necessário para modificação dos grupos silanóis utilizando o APTES. A funcionalização foi avaliada em fase aquosa e em fase orgânica. Os resultados são apresentados na Tabela 4.1.

Tabela 4.1 - Avaliação da imobilização em sílica funcionalizada em fase aquosa e orgânica

Funcionalização da sílica	Atividade Enzimática da enzima imobilizada (U)	Atividade Recuperada de Imobilização (%)
Aquosa	1,19 ^a $\pm$ 0,27	3,98 ^a $\pm$ 0,91
Orgânica	0,11 ^b $\pm$ 0,14	0,35 ^b $\pm$ 0,50

As letras diferentes indicam que há diferença significativa entre as médias ($p < 0,05$)

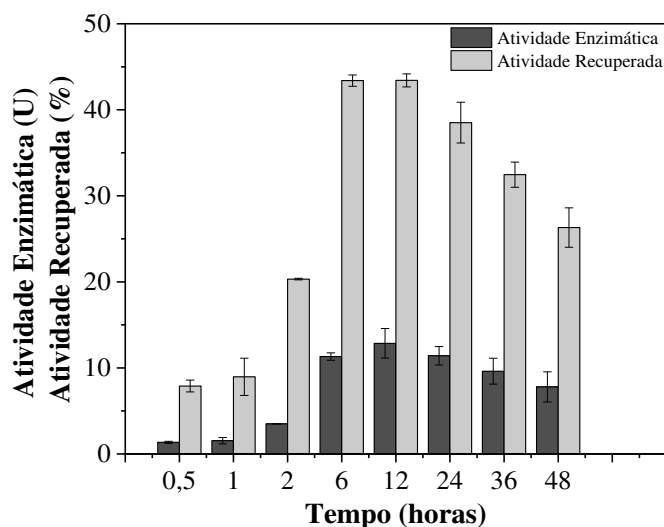
Ao aplicar o teste t de Student o valor de p obtido foi de 0,018 para atividade enzimática na enzima imobilizada e 0,015 para atividade recuperada, os valores são menores que 0,05 o que indica que há diferença significativa entre as médias da via aquosa e orgânica. Como pode ser observado na Tabela 4.1 a funcionalização em via aquosa apresentou atividade enzimática e atividade recuperada mais elevadas, sendo cerca de dez vezes maiores quando comparados com a funcionalização por via orgânica. Dessa forma, optou-se por utilizar a funcionalização

em via aquosa, considerando uma maior facilidade do processo e menor custo, comparando o preço da água aos reagentes orgânicos, como exemplo o tolueno empregado na funcionalização por via orgânica. Para todos os experimentos realizados posteriormente foi feita a funcionalização em via aquosa seguida de ativação com glutaraldeído. Qiao et al. (2015) desenvolveram um processo para silanização de partículas nano-sílicas usando APTES. A funcionalização em via aquosa também foi utilizada.

4.1.1 Avaliação do tempo de imobilização da β -galactosidase

A imobilização da β -galactosidase em sílica de porosidade controlada foi avaliada em diferentes tempos de imobilização, os resultados estão apresentados na Figura 4.1 em relação à atividade enzimática e atividade recuperada da enzima imobilizada.

Figura 4.1 - Avaliação de diferentes tempos de imobilização da β -galactosidase comercial em sílica



É possível observar um aumento da atividade enzimática da enzima imobilizada e da atividade recuperada do menor tempo (0,5 h) até 12 h de imobilização, após esse tempo inicia-se um decréscimo das duas variáveis avaliadas. A redução na atividade enzimática e atividade recuperada para os maiores tempos de imobilização pode indicar uma inativação da enzima. No tempo de 6 e 12 h de imobilização a diferença tanto da atividade enzimática como da atividade recuperada foi pequena, sendo elas de 1,89 U e 1,54%, respectivamente. Aplicando o teste de Tukey foi observado que não há diferença estatística significativa em $p < 0,05$. Sendo

assim, optou-se por trabalhar com o menor tempo, 6 h, devido a pouca diferença das atividades e também por apresentar um menor desvio padrão, consequentemente uma melhor reprodutibilidade. Além disso, menores tempos de imobilização podem ser vantajosos nos processos industriais, considerando uma maior agilidade do processo total, podendo levar à redução de custos devido ao menor tempo de utilização de equipamentos.

Ricardi et al. (2018) e Ricardi et al. (2021) realizaram a imobilização de β -galactosidase de *K. lactis* em sílica, com imobilização em 18 h, tempo superior ao obtido no presente trabalho. Verma et al. (2012), avaliaram a imobilização de β -galactosidase de *K. lactis* em nanopartículas de dióxido de silício por meio de ligação covalente e utilizaram um tempo de 36 horas para o processo de imobilização. Ribeiro et al. (2018) imobilizaram invertase em materiais mesoporosos a base de SBA-15 e após a ativação com glutaraldeído o tempo de imobilização utilizado foi de 24 horas. Dessa forma, pode-se dizer que utilizando o processo de ligação covalente e suportes à base de sílica os tempos requeridos para imobilização serão maiores, entretanto é importante considerar as particularidades de cada processo, como as características do suporte e da enzima, além de condições operacionais. Logo, o tempo de 6 horas se faz favorável atendendo as necessidades do processo. O tempo definido (6 h) é menos longo do que os mencionados por Verma et al. (2012) e Ribeiro et al. (2018), sendo eles respectivamente de 36 e 24 horas. Assim, o tempo de 6 horas pode trazer vantagens para o processo. Podendo agregar até redução de custos, considerando um menor tempo de uso de equipamentos e maior agilidade de produção diária.

4.2 AVALIAÇÃO DAS MELHORES CONDIÇÕES DE IMOBILIZAÇÃO DA β -GALACTOSIDASE COMERCIAL EM SÍLICA DE POROSIDADE CONTROLADA

A partir do Planejamento Composto Central (PCC) foram obtidos os resultados apresentados na Tabela 4.2 para atividade enzimática do biocatalisador imobilizado, atividade recuperada de imobilização e eficiência de imobilização, para as variáveis analisadas concentração de APTES (X_1), atividade inicial da enzima ofertada (X_2) e concentração de glutaraldeído (X_3).

A atividade enzimática da β -galactosidase imobilizada variou entre 0,5 a 41,71 U, a variação da atividade recuperada foi de 7,87 a 47,56% e da eficiência de imobilização foi de 14,62 a 84,00%.

De acordo os resultados obtidos (Tabela 4.2), pode-se observar que a atividade enzimática da β -galactosidase imobilizada foi maior (41,7 U) nas seguintes condições: 1,5% de concentração de APTES, 23,4 U.mL⁻¹ extrato enzimático e 5,5% para concentração de glutaraldeído.

Nas mesmas concentrações de APTES e glutaraldeído também foi observado o maior valor da atividade recuperada (47,56%). Nesta condição, a atividade enzimática ofertada foi menor (7,8 U.mL⁻¹). Para a eficiência de imobilização o melhor valor obtido (84,00%) foi para uma concentração de APTES a 1,0%, atividade enzimática ofertada de 15,6 U.mL⁻¹ de extrato e 6,86% para concentração de glutaraldeído. Comparando esses três experimentos observa-se que a concentração de glutaraldeído necessária para alcançar os melhores valores foi em concentrações maiores que 5,5%.

Tabela 4.2 - Matriz com os resultados obtidos da imobilização de β -galactosidase (Lactozyme® 2600 L) em sílica

Experimento	X ₁ (%)	X ₂ (U. mL ⁻¹)	X ₃ (%)	AE (EI) (U)	AR (%)	E (%)
1	0,5 (-1)	7,8 (-1)	1,5 (-1)	8,59	25,88	28,44
2	0,5 (-1)	23,4 (+1)	5,5 (+1)	40,41	21,51	66,60
3	1,5 (+1)	7,8 (-1)	5,5 (+1)	18,27	47,56	53,05
4	1,5 (+1)	23,4 (+1)	1,5 (-1)	23,92	13,80	48,60
5 (C)	1 (0)	15,6 (0)	3,5 (0)	32,21	39,62	62,66
6	0,5 (-1)	7,8 (-1)	5,5 (+1)	15,35	31,56	34,62
7	0,5 (-1)	23,4 (+1)	1,5 (-1)	13,64	7,87	36,35
8	1,5 (+1)	7,8 (-1)	1,5 (-1)	23,26	44,10	42,21
9	1,5 (+1)	23,4 (+1)	5,5 (+1)	41,71	24,16	76,39
10 (C)	1 (0)	15,6 (0)	3,5 (0)	32,03	39,40	64,96
11	0,16 (- α)	15,6 (0)	3,5 (0)	12,8	15,74	14,62
12	1,84 (+ α)	15,6 (0)	3,5 (0)	27,63	33,98	43,43
13	1 (0)	0,26 (- α)	3,5 (0)	0,5	23,16	25,79
14	1 (0)	28,6 (+ α)	3,5 (0)	38,16	21,26	80,20
15	1 (0)	15,6 (0)	0,14 (- α)	10,56	21,59	35,08
16	1 (0)	15,6 (0)	6,86 (+ α)	40,17	45,57	84,00
17 (C)	1 (0)	15,6 (0)	3,5 (0)	32,32	30,21	64,04

X₁: Concentração de APTES; X₂: Atividade Inicial Ofertada; X₃: Concentração de Glutaraldeído

AE (EI): atividade enzimática da enzima imobilizada

AR: atividade recuperada

E: eficiência de imobilização

Realizou-se a análise da significância dos parâmetros do modelo a partir dos p-valores encontrados pelo teste t de Student, considerado um nível de significância de 90%. Utilizando os resultados, para atividade enzimática da enzima imobilizada (AE), atividade recuperada da imobilização (AR) e eficiência da imobilização (E), após a regressão múltipla, obtiveram-se as Equações 4.1, 4.2 e 4.3, respectivamente. Os modelos estão apresentados em suas formas reduzidas, considerando que algumas variáveis não foram significativas. Os parâmetros com nível de significância menor que 10% ($p < 0,10$) foram considerados significativos. Os coeficientes de determinação (R^2) obtidos após os ajustes dos dados experimentais aos modelos foram 0,97 para a atividade enzimática da enzima imobilizada; 0,81 para atividade recuperada e 0,96 para eficiência, mostrando boa concordância entre os valores experimentais e os previstos pelos modelos.

$$\text{Atividade da Enzima Imobilizada} = 32,45 + 3,96X_1 - 4,06X_1^2 + 7,93X_2 - 3,52X_2^2 + 7,04X_3 - 2,24X_3^2 - 2,59X_1X_3 + 5,35X_2X_3 \quad (4.1)$$

$$\text{Atividade Recuperada} = 37,51 + 5,38X_1 - 4,66X_1^2 - 6,61X_2 - 5,43X_2^2 + 5,38X_3 \quad (4.2)$$

$$\text{Eficiência} = 62,57 + 7,52X_1 - 11,80X_1^2 + 11,17X_2 - 2,61X_2^2 + 5,13X_3 + 5,12X_2X_3 \quad (4.3)$$

Na Equação 4.1 pode-se observar que as três variáveis X_1 , X_2 e X_3 apresentaram efeitos positivos, sendo que, aumentando a concentração de APTES, a atividade inicial ofertada e a concentração de glutaraldeído haverá uma maior atividade enzimática da enzima imobilizada. Para atividade recuperada, (Equação 4.2) X_1 e X_3 apresentam efeitos positivos, enquanto X_2 apresenta efeito negativo. Logo, um aumento dessa variável gera uma redução no valor da resposta, ou seja, a atividade recuperada é inversamente proporcional à atividade inicial ofertada, sendo possível notar essa relação pela influência das variáveis. Na Equação 4.3 para eficiência de imobilização as variáveis X_1 , X_2 e X_3 apresentaram efeitos positivos, sendo que quanto maior for o valor do coeficiente maior impacto no valor da resposta.

Foi realizada a análise de variância (ANOVA), para cada uma das respostas estudadas e os valores de F_{cal} (calculado) estão apresentados nas Tabelas 4.3 a 4.5, para as respostas atividade da enzima imobilizada, atividade recuperada e eficiência de imobilização, respectivamente.

Tabela 4.3 - ANOVA para resposta da atividade da enzima imobilizada em sílica

Fonte de variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F_{calc}	p-valor
Regressão	2509,131	9	278,79	32,04	0,99998
Resíduos	60,907	7	8,70		
Total	2570,038	16			

$$F_T = F_{9; 7; 0,10} = 2,725$$

Tabela 4.4 - ANOVA para resposta da atividade recuperada da enzima imobilizada em sílica

Fonte de variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F_{calc}	p-valor
Regressão	2045,616	9	227,29	6,1351	0,99998
Resíduos	259,335	7	37,05		
Total	2304,951	16			

$$F_T = F_{9; 7; 0,10} = 2,725$$

Tabela 4.5 - ANOVA para resposta da eficiência da enzima imobilizada em sílica

Fonte de variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F_{calc}	p-valor
Regressão	6459,532	9	717,73	23,05	0,99998
Resíduos	217,989	7	31,14		
Total	6677,521	16			

$$F_T = F_{9; 7; 0,10} = 2,725$$

Pelos valores obtidos na ANOVA observa-se que o F calculado (F_{calc}) foi superior ao F tabelado (F_T) para um nível de significância de 10% para as três respostas, atividade da enzima imobilizada (Tabela 4.4), atividade recuperada (Tabela 4.5) e eficiência de imobilização (Tabela 4.6). Esses resultados indicam uma boa concordância entre os valores experimentais e previstos pelo modelo. Com os modelos obtidos e a validação por meio da ANOVA, foi possível construir as curvas de contorno e superfícies de respostas para a influência conjunta das três variáveis analisadas em cada uma das respostas, atividade da enzima imobilizada (Figura 4.2), atividade recuperada (Figura 4.3) e eficiência de imobilização (Figura 4.4).

Figura 4.2 - Superfícies de respostas e curvas de contorno para influência das três variáveis na resposta de atividade da enzima imobilizada

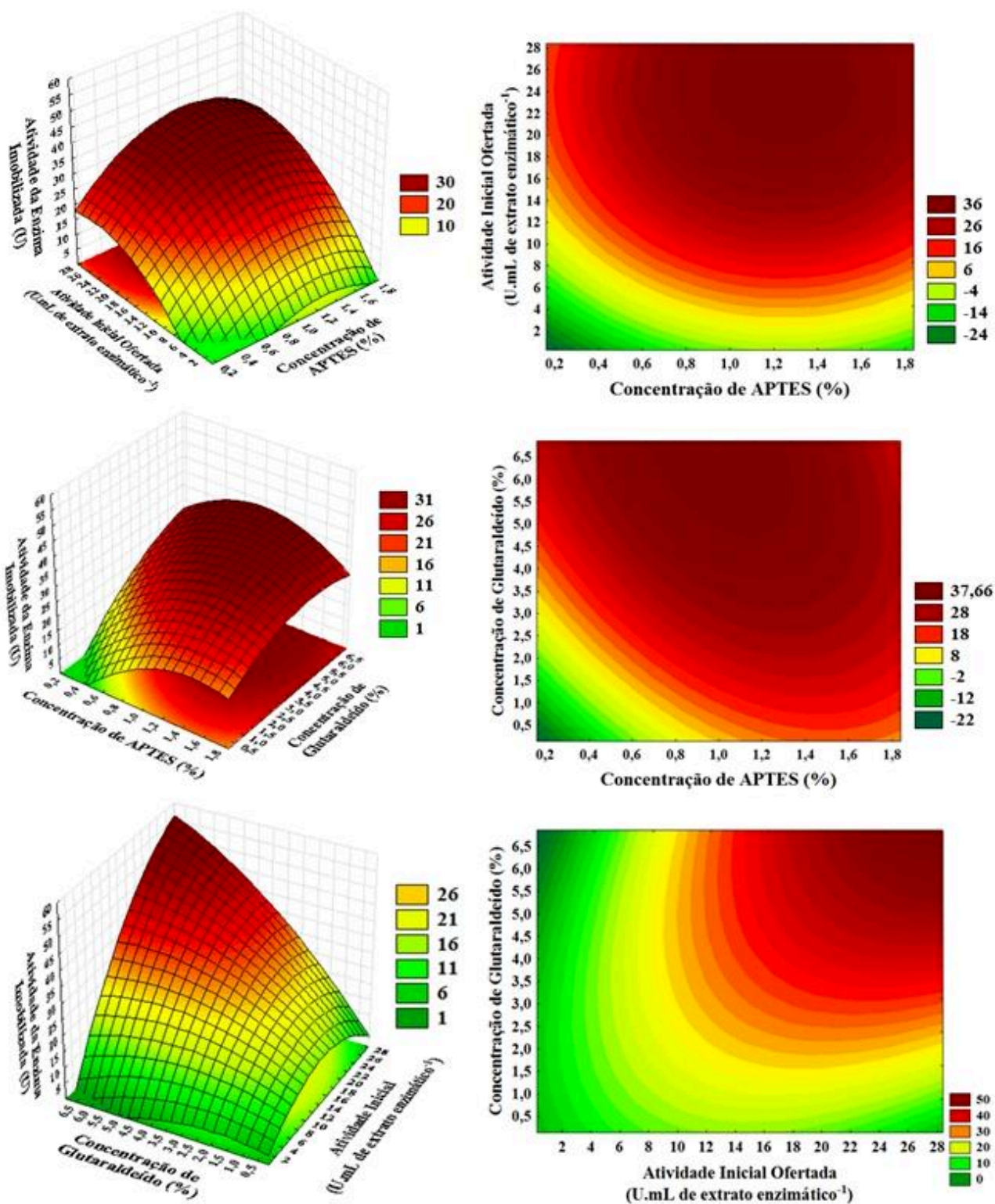


Figura 4.3 - Superfícies de respostas e curvas de contorno para influência das três variáveis na resposta de atividade recuperada

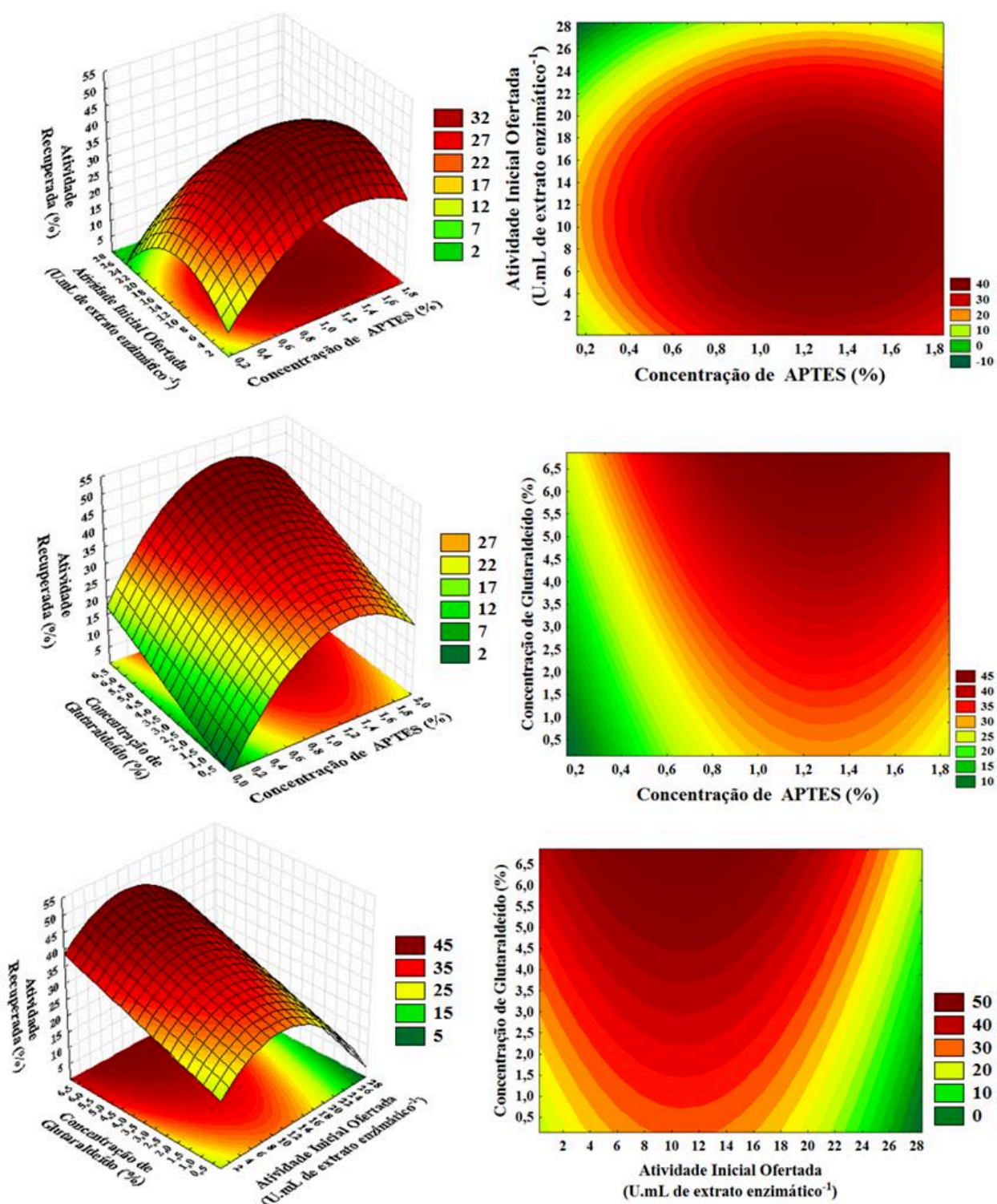
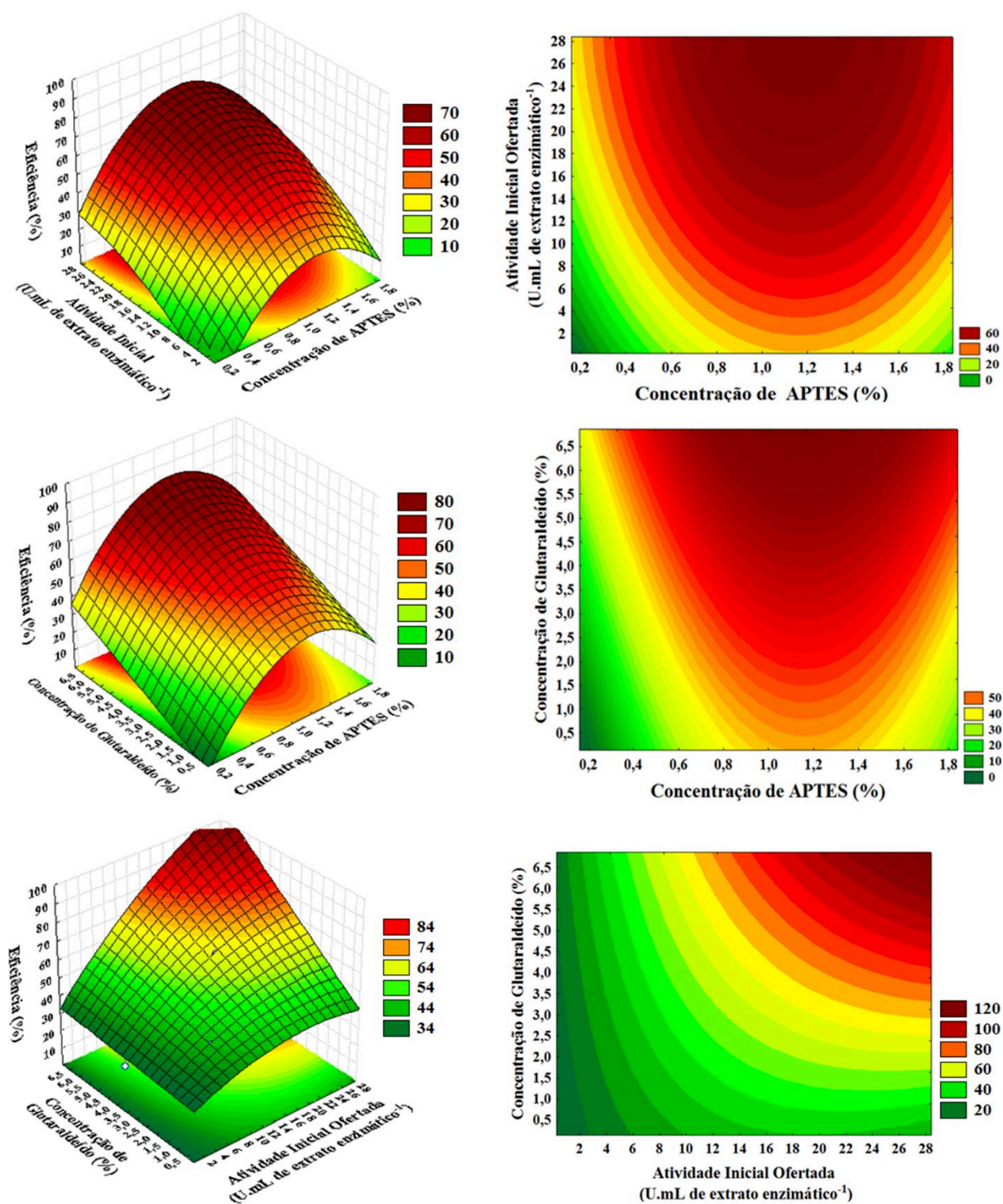


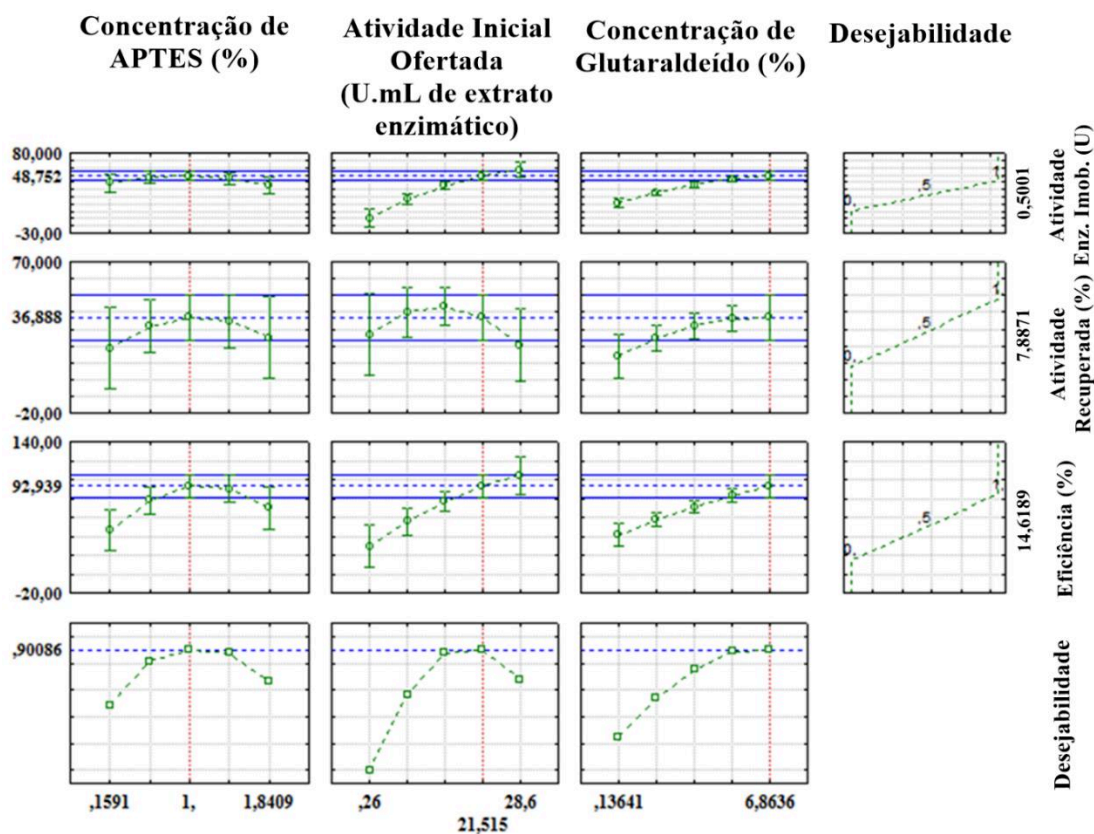
Figura 4.4 - Superfícies de respostas e curvas de contorno para influência das três variáveis na resposta de eficiência da imobilização



As curvas de contorno e as superfícies de resposta mostram as regiões de otimização. Na Figura 4.2 (resposta de atividade da enzima imobilizada) observam-se valores de concentração de APTES de 0,7 a 1,6%, concentração de glutaraldeído maior que 6,0% e atividade inicial da enzima ofertada maior que 20 U.mL⁻¹ de extrato. Para Figura 4.3 (resposta de atividade recuperada), notam-se valores de concentração de APTES de 1,0 a 1,5%, concentração de glutaraldeído maior que 6,0% e atividade inicial da enzima ofertada entre 8 a 16 U.mL⁻¹ de extrato. E para Figura 4.4 (resposta de eficiência da imobilização) os resultados mostram variações de concentração de APTES de 1,0 a 1,4%, concentração de glutaraldeído maior que 6,0% e atividade inicial da enzima ofertada maior que 20 U.mL⁻¹ de extrato. Com base nos ensaios são apresentados nas figuras as faixas obtidas, pode-se dizer que a região ótima está na faixa de concentração de APTES de 1,0 a 1,4% e concentração de glutaraldeído maior de 6,0%. Para a atividade inicial da enzima ofertada fixou-se a região apresentada nas Figuras 4.2 e 4.4, sendo valores entre 20 e 28,6 U.mL⁻¹ de extrato.

Para obtenção do ponto ótimo real foi realizada a análise de desejabilidade, pelo software *Statistica*® 7.0, apresentada na Figura 4.5.

Figura 4.5 - Análise de desejabilidade da avaliação simultânea das respostas de atividade inicial da enzima ofertada e eficiência de imobilização com influência das três variáveis (X_1 , X_2 e X_3) analisadas



De acordo com a análise da desejabilidade (Figura 4.5), foi definido como ponto ótimo a concentração de APTES em 1,0%, atividade inicial da enzima ofertada em 21 U.mL⁻¹ de extrato enzimático e concentração de glutaraldeído em 6,86%. Comparando as observações realizadas pelas superfícies de resposta e curvas de contorno com as da análise de desejabilidade nota-se semelhança, indicando a região ótima.

A concentração de APTES é uma variável relevante no processo de imobilização. Esse agente é o silanizador que promove a modificação superficial da sílica adicionando grupos funcionais para posterior ligação com a enzima, ele aumenta a superfície hidrofóbica pela presença dos grupos propila e reduz os grupos hidroxila livres (SHAH et al., 2008; BOURKAIB et al., 2021). Como foi observado no ponto ótimo, a concentração de APTES deve ser intermediária, sendo definida em 1,0%. O APTES aumenta o desempenho catalítico das enzimas, melhorando a posição do sítio ativo, devido ao aumento da superfície hidrofóbica (BOURKAIB et al., 2021). Qiao et al. (2015) utilizaram o APTES para funcionalização e também definiram uma condição intermediária de APTES (1,3% v.v⁻¹).

O glutaraldeído é o agente bifuncional que realiza a forte ligação do suporte à enzima, formando uma ligação covalente. Um grupo aldeído de sua molécula reage com o grupo amino da enzima e o outro grupo aldeído de sua molécula reage com o suporte. Nesse caso, foi observado que quanto maior a concentração do agente, maior seriam os valores obtidos para atividade da enzima imobilizada, atividade recuperada e eficiência de imobilização. Ricardi et al. (2018) também utilizaram solução de glutaraldeído para ativação dos suportes sílica/quitosa para imobilização de β -galactosidase de *K. lactis*. Uma concentração de 5,0% de glutaraldeído foi utilizada, um valor relativamente menor que o utilizado neste trabalho de 6,86%. As duas variáveis concentração de APTES e de glutaraldeído que foram analisadas são de fundamental importância para imobilização, pois são responsáveis pelas etapas que preparam o suporte, para receber a enzima, sendo assim a otimização dessas variáveis traz inúmeras vantagens para maximizar a imobilização da β -galactosidase.

Em relação à atividade inicial ofertada é necessário ter um equilíbrio, considerando que o seu aumento será eficiente para aumentar a atividade da enzima imobilizada e a eficiência de imobilização, porém maiores concentrações levarão a uma menor resposta da atividade recuperada além de aumento nos custos do processo. Sendo assim, ficou definido o valor de 21 U.mL⁻¹ de extrato enzimático. Alguns estudos da literatura relatam que pode haver a saturação do suporte em altas ofertas enzimáticas, nesse caso mesmo que seja ofertado uma maior quantidade de enzima o suporte não terá sítio ativo disponível para ligação com a enzima (LIU et al., 2012; SOUSA et al., 2021). Sousa et al. (2021) avaliaram a imobilização de β -

galactosidase de *K. marxianus* em Duolite® A-568, variando a atividade ofertada de 18,59 a 35,41 U, sendo obtido como ótimo o valor de 27 U, uma atividade intermediária, que foi justificada pela saturação do suporte. O modelo obtido da otimização da imobilização no trabalho citado também apresentou efeito negativo da variável atividade inicial da enzima oferta sobre a resposta atividade recuperada.

Foi realizado um experimento de validação para os modelos na condição otimizada: concentração de APTES 1,0%, atividade inicial da enzima ofertada em 21 U.mL⁻¹ e concentração de glutaraldeído em 6,86%. A atividade enzimática da enzima imobilizada foi de $44,67 \pm 2,53$ U, valor próximo ao predito pelo modelo de 47,94 U, o erro foi de 7,32%. Para a resposta da atividade recuperada obteve-se $28,61 \pm 6,26\%$, sendo previsto pelo modelo 39,40%. A diferença de uma dezena na resposta medida e calculada pelo modelo, representa um erro de 27,38%. Nesse caso, o modelo não foi tão eficiente para prever a realidade experimental. Contudo, é importante considerar a variabilidade dos resultados, uma vez que os desvios estão na ordem de 6,26% para atividade recuperada da β -galactosidase imobilizada, levando a uma menor reprodutibilidade. Para eficiência de imobilização obteve-se o valor de $100 \pm 0,0\%$, sendo o valor esperado de 94,33%, o erro obtido foi de 6,01%.

4.3 REAVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE APTES NA IMOBILIZAÇÃO DA β -GALACTOSIDASE COMERCIAL EM SÍLICA DE POROSIDADE CONTROLADA

A melhor região obtida na avaliação da imobilização da β -galactosidase comercial em sílica foi em concentração de APTES a 1,0%, atividade inicial da enzima ofertada em 21 U.mL de extrato enzimático⁻¹ e concentração de glutaraldeído em 6,86%. Entretanto, a concentração de APTES foi reavaliada, considerando o alto valor agregado do produto. Os resultados são apresentados na Tabela 4.6.

Tabela 4.6 - Avaliação da concentração de APTES 0,6 e 1,0% na imobilização da β -galactosidase comercial em sílica

Concentração de APTES (%)	Atividade Enzimática do biocatalisador imobilizado (U)	Atividade Recuperada (%)
0,6	$39,90^a \pm 2,44$	$26,24^a \pm 1,60$
1,0	$41,45^a \pm 2,90$	$26,90^a \pm 0,91$

As letras iguais nas colunas indicam que não há diferença significativa entre as médias ($p < 0,05$).

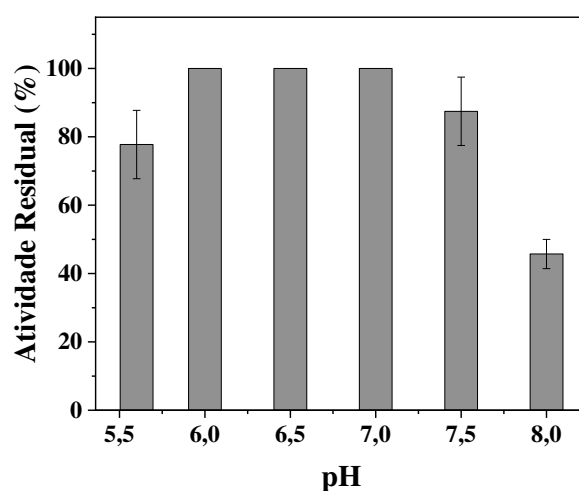
Pelo o teste t de Student tanto a atividade enzimática quanto a atividade recuperada não apresentaram diferenças estatísticas em nível de significância de 0,05. A redução desse reagente pode levar a uma economia no processo, sendo ele bastante oneroso principalmente considerando uma escala industrial.

4.4 CARACTERIZAÇÃO DA β -GALACTOSIDASE COMERCIAL IMOBILIZADA EM SÍLICA

4.4.1 Influência do pH e temperatura na atividade da enzima imobilizada

A atividade da β -galactosidase imobilizada é influenciada diretamente pelo pH do meio, como pode ser observado na Figura 4.6, na qual a atividade aumenta do pH 5,6 ao pH 7,0 e após esse valor ela passa por uma redução. A maior atividade é obtida em pH 7,0 mantendo cerca de 100% da atividade inicial. A menor atividade (retenção de ~ 50%) foi observada em pH 8,0. Do pH 6,5 ao 7,5 a atividade manteve-se maior que 80%. Os resultados eram esperados considerando as características da β -galactosidase de *K. lactis* que apresenta pH ótimo igual a 7,0 (ANSARI; HUSAIN, 2011). Klein et al. (2013) também estudaram o pH ótimo para β -galactosidase de *K. lactis* livre e imobilizada em quitosana. O melhor pH para a enzima livre foi em 6,5, sendo que com a enzima imobilizada a faixa ótima foi ampliada de 6,5 a 7,0, o que corrobora com o presente estudo que teve pH ótimo entre 6,0 a 7,0. Ainda é possível notar as mudanças que podem ocorrer após os processos de imobilização.

Figura 4.6 - Influência de diferentes valores de pH na atividade enzimática da β -galactosidase (Lactozyme® 2600 L) imobilizada em sílica

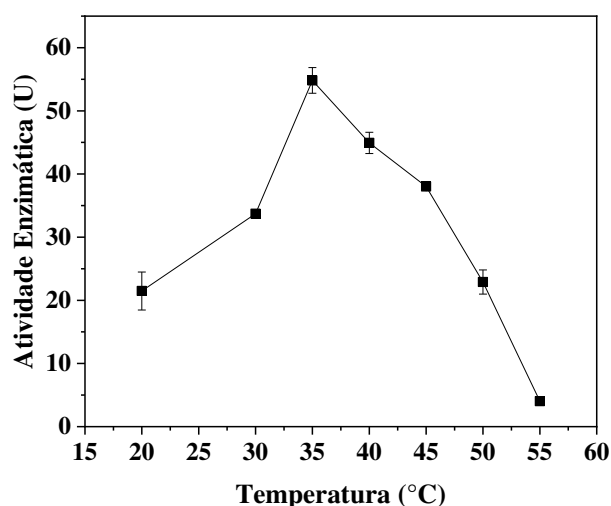


A atividade catalítica da enzima está ligada à sua conformação proteica e uma mínima alteração pode levar à perda de atividade catalítica, o que justificaria a redução de atividade em pH 8,0, que apresentou menor atividade, visto que, condições muito severas de pH podem levar ao desdobramento da estrutura proteica.

Outros estudos também obtiveram como resultado pH 7,0 como ótimo para β -galactosidase imobilizada: Verma et al. (2012) para β -galactosidase de *K. lactis* imobilizada em nanopartículas de dióxido de silício; Ricardi et al. (2018) para β -galactosidase de *K. lactis* imobilizada em sílica e quitosana e Argenta; Nogueira; Scheer (2021) para β -galactosidase de *K. lactis* imobilizada em esferas de alginato de cálcio. A melhor atividade em pH 7,0 possibilita aplicação no leite considerando que este apresenta pH entre 6,6 a 6,8.

A temperatura também afetou a atividade enzimática do biocatalisador imobilizado, como pode ser observado na Figura 4.7. A atividade enzimática avaliada foi crescente entre 20 e 35 °C. A máxima atividade enzimática alcançada foi em 35 °C sendo de $54,81 \pm 2,00$ U. Após os 35 °C, entre 40 e 55 °C a atividade enzimática decresceu, sendo que em 55 °C a atividade da enzima imobilizada era de apenas $4,04 \pm 0,02$ U. Em 40 °C a enzima apresentou também uma boa atividade, foi a segunda melhor ($44,92 \pm 1,68$ U).

Figura 4.7 - Influência da temperatura na atividade enzimática da β -galactosidase (Lactozyme® 2600 L) imobilizada em sílica



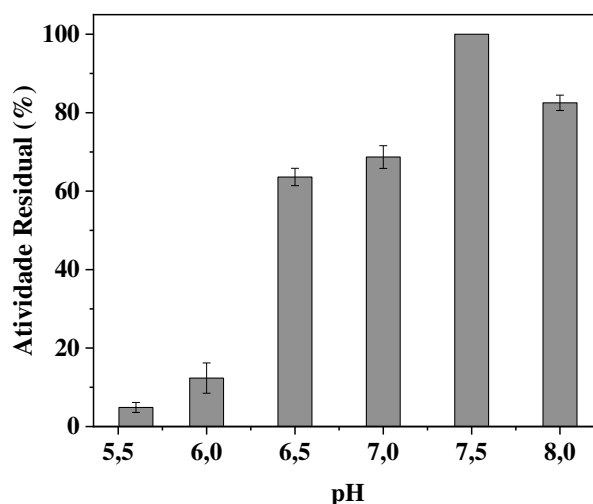
Outros trabalhos também avaliaram a temperatura ótima da β -galactosidase de *K. lactis* imobilizada encontrando temperaturas próximas as obtidas neste trabalho. Argenta; Nogueira; Scheer (2021) avaliaram a temperatura ótima da β -galactosidase de *K. lactis* imobilizada em

esferas de alginato de cálcio e também encontraram como temperatura ótima 35 °C. O conhecimento da temperatura ótima é necessário para utilização da enzima nos processos industriais, para que ela tenha o melhor desempenho possível.

4.4.2 Estabilidade ao pH da enzima imobilizada

A atividade catalítica das enzimas está fortemente ligada ao pH do meio, dessa forma a estabilidade ao pH foi verificada e pode ser observada na Figura 4.8.

Figura 4.8 - Influência de diferentes pH na estabilidade da β -galactosidase (Lactozyme® 2600 L) imobilizada em sílica



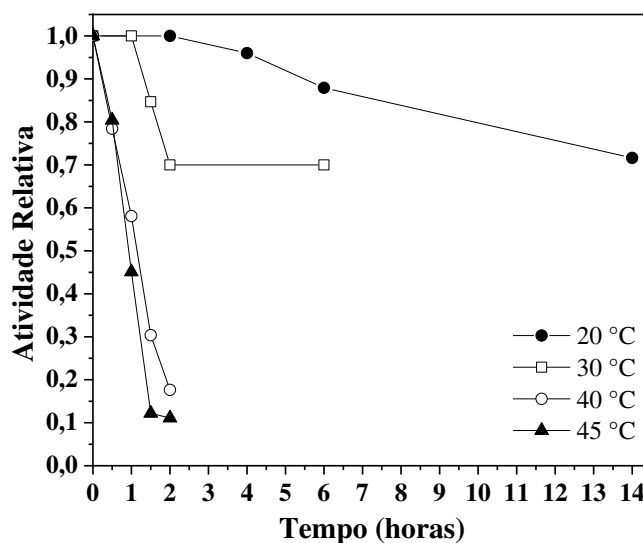
A β -galactosidase imobilizada foi estável na faixa de pH entre 6,5 a 8,0, mantendo a sua atividade superior a 60%. Em pH mais baixo avaliado em 5,6, a enzima praticamente não apresentou estabilidade, sendo a atividade residual menor que 10%. A maior estabilidade foi obtida em pH 7,5, no qual a enzima manteve 100% da sua atividade inicial. Sousa et al. (2021), estudaram a estabilidade da β -galactosidase de *K. marxianus* em sua forma livre. A maior estabilidade foi em pH 7,3, sendo que para o pH 8,0 a enzima manteve apenas 33,58% da sua atividade inicial. Comparando com os resultados da enzima imobilizada observa-se um aumento no perfil de estabilidade, uma vez que em pH 8,0 a enzima ainda manteve cerca de 80% da sua atividade inicial. Wolf; Tambourgi; Paulino (2021) incubaram β -galactosidase de *K. lactis* imobilizada em hidrogéis de polissacarídeos e alcançaram maior conversão de lactose

em amostras incubadas a pH 7,5. O conhecimento da estabilidade ao pH é fundamental quando se pensa nas condições do processo e também em relação ao armazenamento da enzima.

4.4.3 Estabilidade térmica da enzima imobilizada

A estabilidade térmica da β -galactosidase imobilizada em sílica foi avaliada em diferentes temperaturas. As atividades relativas em função do tempo de incubação são ilustradas na Figura 4.9. A temperatura exerce grande influência sobre a atividade da β -galactosidase, sendo fundamental o conhecimento dessa característica para aplicação nos processos industriais.

Figura 4.9 - Perfis de inativação térmica da β -galactosidase (Lactozyme[®] 2600 L) imobilizada em sílica



De acordo com os perfis de inativação térmica obtidos, pode ser observado que a temperatura afeta diretamente a estabilidade da enzima, sendo que a partir de 40 °C a redução foi rápida e expressiva. Para 20 °C a redução da atividade enzimática foi lenta, indicando uma ótima estabilidade nesta condição. Comparando com os demais perfis observa-se que a menor desativação por temperatura foi em 20 °C. A atividade enzimática manteve-se alta, sendo que em 14 horas a enzima ainda apresentava cerca de 70% da sua atividade inicial. Para 30 °C a enzima imobilizada manteve cerca de 70% da sua atividade inicial até o tempo de 6 horas, sendo a inativação mais lenta, comparando com as outras temperaturas de 40 e 45 °C. Em 2 horas de

incubação as enzimas a 40 °C e 45 °C apresentaram grande queda nas suas atividades, com atividades relativas de 17,64% e 11,10%, respectivamente, valores que podem comprometer o desempenho da enzima nos processos. A inativação das enzimas em altas temperatura pode ser atribuída ao desdobramento das estruturas das proteínas, que gera uma estrutura enrolada aleatoriamente sem atividade enzimática (ADAMS, 1991). Assim, temperaturas mais amenas (20 a 30 °C) são recomendadas como faixa de trabalho da β -galactosidase comercial imobilizada em sílica. O que facilita sua aplicação, uma vez, que a hidrólise industrial da lactose normalmente é feita em temperaturas mais baixas (< 20 °C).

Sousa et al. (2021) avaliaram a estabilidade térmica da β -galactosidase de *K. marxianus* em sua forma livre. Em 40 e 50 °C após 1 hora de incubação a enzima reduziu mais de 80% da sua atividade inicial. Comparando com os resultados obtidos para a enzima imobilizada observa-se que a 40 e 45 °C o processo de desativação foi mais lento, mantendo atividade até 2 horas. Ricardi et al. (2018) observaram também uma rápida perda de atividade da β -galactosidase imobilizada em sílica e quitosana em altas temperaturas (60 e 70 °C), entretanto ainda conseguiram uma maior estabilidade, pois em 40 °C, a enzima manteve cerca de 45% da sua atividade em cerca de 6 horas de incubação.

Aos resultados da atividade enzimática residual deste trabalho em função do tempo de incubação, para cada temperatura foram ajustados os modelos de desativação térmica de primeira ordem (Equação 3.7), e modelo de desativação enzimática com um estágio (Equação 3.8). Os ajustes foram realizados pelo método numérico de Levenberg-Marquardt, usando o software *Statistica*® 7.0, para determinar os parâmetros cinéticos pelos melhores ajustes (MORE; WATSON, 1977; HENLEY; SADANA, 1985).

Na Tabela 4.7 são apresentados os coeficientes de determinação para cada equação, a soma dos quadrados dos desvios com os respectivos parâmetros ajustados e análise de significância, utilizando o teste t de Student e adotando como parâmetros significativos os que apresentaram níveis de significância menores que 10%.

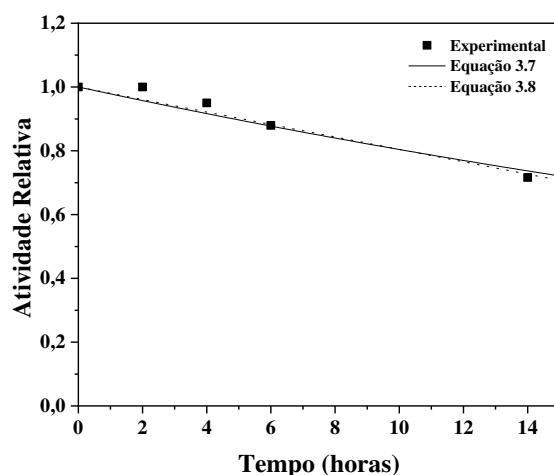
Como critério de escolha, optou-se pelo ajuste que mais se adequava aos resultados experimentais, sendo o modelo escolhido o que apresentasse significado físico dos parâmetros coerentes com o maior valor de coeficiente de determinação (R^2) e o menor valor da soma do quadrado dos desvios.

Tabela 4.7 - Ajuste dos dados experimentais aos modelos de desativação térmica de primeira ordem e em um estágio para β -galactosidase comercial imobilizada

T (°C)	Equação	k_d	Valor -p	R^2	$\sum(V-V_{mod.})^2$	α_1	Valor -p
20	3.7	0,021805	0,000768	0,94	0,003382	-	-
20	3.8	0,000900	0,986899	0,96	0,002470	-20,8290	0,986010
30	3.7	0,086902	0,013559	0,71	0,030789	-	-
30	3.8	0,317846	0,356723	0,80	0,023604	0,572915	0,072698
40	3.7	0,688578	0,000759	0,96	0,020343	-	-
40	3.8	0,105390	0,511263	0,99	0,003380	-3,43877	0,574412
45	3.7	0,900104	0,004511	0,92	0,051521	-	-
45	3.8	0,294970	0,475592	0,96	0,026454	-1,13682	0,619813

De acordo com os resultados obtidos pela modelagem de desativação térmica nas temperaturas avaliadas, verifica-se que o modelo de desativação térmica de primeira ordem (Equação 3.7) se ajustou para todas as temperaturas. Enquanto, o modelo de desativação térmica com um estágio (Equação 3.8) foi significativo apenas para a temperatura de 30 °C. Logo, foi considerado somente o modelo de desativação térmica de primeira ordem para definição dos parâmetros. Os resultados experimentais de atividade relativa e os preditos pelos dois métodos são comparados nas Figuras 4.10 a 4.13. As Equações 4.4 a 4.7 correspondem a Equação 3.7 do modelo de desativação térmica de primeira ordem, com substituição da constante cinética de desativação térmica (k_d) calculada para cada temperatura.

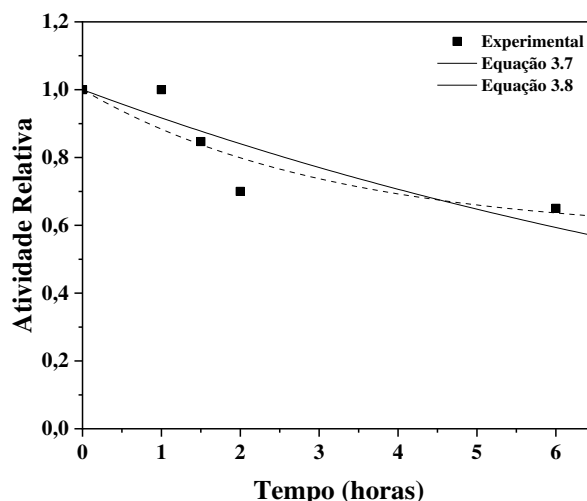
Figura 4.10 - Perfil de inativação térmica a 20 °C da β -galactosidase (Lactozyme® 2600 L) imobilizada em sílica. Ajuste de modelo matemático aos resultados experimentais: (—) Equação 3.7. Modelo de desativação térmica de primeira ordem; (----) Equação 3.8. Modelo desativação térmica com um estágio.



Na Figura 4.10 verifica-se um ótimo ajuste entre os valores experimentais e teóricos ao modelo de desativação térmica de primeira ordem com coeficiente de determinação de 0,94 e a soma dos quadrados dos desvios igual a 0,003382. O modelo de desativação térmica de primeira ordem com um estágio apresentou maior correlação, entretanto os parâmetros não foram significativos em 10%. O parâmetro ajustado ao modelo de desativação térmica de primeira ordem está representado na Equação 4.4.

$$\frac{A}{A_0} = e^{(-0,021805 \times t)} \quad (4.4)$$

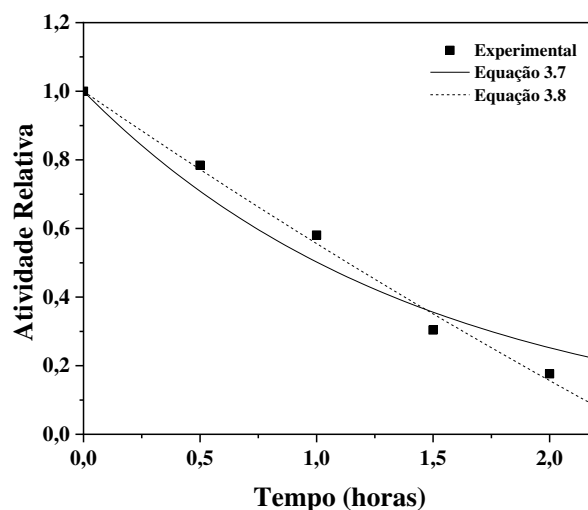
Figura 4.11 - Perfil de inativação térmica a 30 °C da β -galactosidase (Lactozyme® 2600 L) imobilizada em sílica. Ajuste de modelo matemático aos resultados experimentais: (—) Equação 3.7. Modelo de desativação térmica de primeira ordem; (---) Equação 3.8. Modelo de desativação térmica com um estágio.



Na Figura 4.11 verifica-se que o ajuste entre os valores experimentais e teóricos ao modelo de desativação térmica de primeira ordem não foi bom, o coeficiente de determinação de 0,71 é baixo, entretanto a soma dos quadrados dos desvios foi de 0,030789. O modelo de desativação térmica de primeira ordem com um estágio apresentou maior correlação, porém os parâmetros não foram significativos em 10%. Assim, considerou o ajuste mesmo com esse baixo coeficiente de determinação, todavia seria necessário verificar esse tempo de meia-vida. Pois, com os experimentos realizados em 6 horas de incubação a enzima ainda apresentava cerca de 70% da sua atividade inicial. O parâmetro ajustado ao modelo de desativação térmica de primeira ordem está representado na Equação 4.5.

$$\frac{A}{A_0} = e^{(-0,086902 \times t)} \quad (4.5)$$

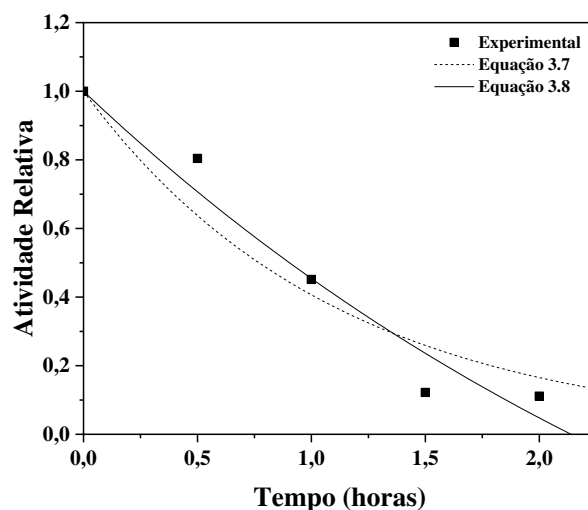
Figura 4.12 - Perfil de inativação térmica a 40 °C da β -galactosidase (Lactozyme® 2600 L) imobilizada em sílica. Ajuste de modelo matemático aos resultados experimentais: (—) Equação 3.7. Modelo de desativação térmica de primeira ordem; (-----) Equação 3.8. Modelo desativação térmica com um estágio.



A Figura 4.12 mostra um ótimo ajuste dos valores experimentais e teóricos para o modelo de desativação térmica de primeira ordem com coeficiente de determinação de 0,96 e a soma dos quadrados dos desvios igual a 0,020343. Da mesma forma que para 30 °C, o modelo de desativação térmica de primeira ordem com um estágio apresentou maior correlação, entretanto os parâmetros não foram significativos em 10,00%. O parâmetro ajustado ao modelo de desativação térmica de primeira ordem está representado na Equação 4.6.

$$\frac{A}{A_0} = e^{(-0,688578 \times t)} \quad (4.6)$$

Figura 4.13 - Perfil de inativação térmica a 45 °C da β -galactosidase (Lactozyme® 2600 L) imobilizada em sílica. Ajuste de modelo matemático a os resultados experimentais: (—) Equação 3.7. Modelo de desativação térmica de primeira ordem; (---) Equação 3.8. Modelo desativação térmica com um estágio.



A Figura 4.13 mostra o ótimo ajuste dos valores experimentais e teóricos para o modelo de desativação térmica de primeira ordem com coeficiente de determinação de 0,92 e a soma dos quadrados dos desvios igual a 0,051521. O modelo de desativação térmica de primeira ordem com um estágio apresentou uma maior correlação, porém os parâmetros não foram significativos em 10%. O parâmetro ajustado ao modelo de desativação térmica de primeira ordem está representado na Equação 4.7.

$$\frac{A}{A_0} = e^{(-0,900104 \times t)} \quad (4.7)$$

Com as constantes de desativação térmica (k_d) que foram ajustadas com o modelo de desativação térmica de primeira ordem (Equação 3.7) foi possível calcular os tempos de meia-vida para cada temperatura. Os resultados estão apresentados na Tabela 4.8.

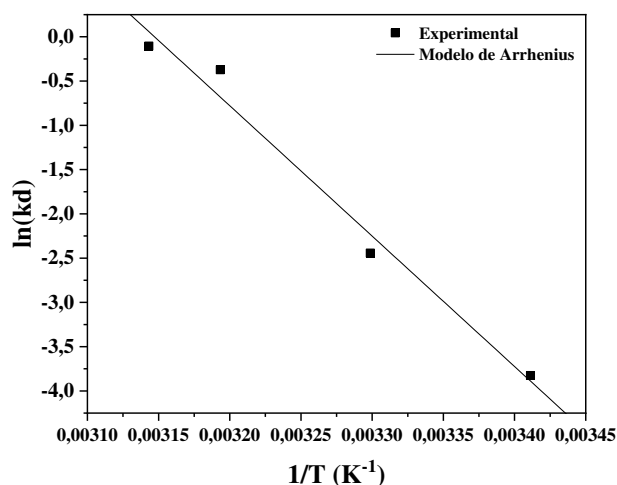
A β -galactosidase imobilizada em sílica apresentou maior tempo de meia-vida (31,79 h) quando incubada à 20 °C. O segundo maior tempo de meia-vida foi obtido a 30 °C, sendo de 7,98 h. Para as temperaturas de 40 e 45 °C os tempos de meia-vida foram bem menores 1,00 e 0,77 h, respectivamente. De acordo com essas reduções consideráveis de atividade e também analisando a Figura 4.9, fica claro que a enzima de *K. lactis* mesmo em sua forma imobilizada é mais estável a temperaturas mais amenas como foi mostrado para 20 e 30 °C.

Tabela 4.8 - Constantes de desativação térmica (k_d) e tempos de meia-vida para cada temperatura, obtidos pelo modelo de desativação térmica de primeira ordem

Temperatura (°C)	k_d (h ⁻¹)	R ²	$t_{1/2}$ (h)
20	0,021805	0,94	31,79
30	0,086902	0,71	7,98
40	0,688578	0,96	1,00
45	0,900104	0,92	0,77

A energia de ativação do processo de desativação térmica foi determinada através do ajuste das constantes de desativação térmica (k_d) em função das temperaturas, pelo modelo de Arrhenius (Equação 3.11), utilizando o software Origin[®] Pro. Assim, foi obtida a Figura 4.14 e a Equação 4.8.

Figura 4.14 - Modelo obtido por Arrhenius (—) como os resultados experimentais (k_d)



$$\ln(k_d) = -14725 \cdot \frac{1}{T} + 46,34 \quad (4.8)$$

O coeficiente de determinação para o ajuste linear de Arrhenius (Equação 4.8), foi de 0,98 e a energia de ativação do processo de desativação térmica (E_a) calculada foi de 122,43 kJ.mol⁻¹. A energia de ativação do processo de desativação térmica (E_a) mostra a sensibilidade da enzima em relação as mudanças de temperatura e utilizada para calcular os parâmetros termodinâmicos.

4.4.4 Parâmetros termodinâmicos relativos à ativação e desativação térmica

Conhecer os parâmetros termodinâmicos é um diferencial que pode levar a compreensão do possível mecanismo de desnaturação da enzima (USTOK; TARI; HARSA, 2010). Na Tabela 4.9 são apresentadas as estimativas dos parâmetros termodinâmicos que foram calculados conforme as Equações 3.12, 3.13 e 3.14, considerando o valor obtido para energia de ativação do processo de desativação térmica (E_a) e as constantes de desativação térmica (k_d) calculadas anteriormente (item 4.4.3) para β -galactosidase imobilizada em sílica.

Tabela 4.9 - Parâmetros termodinâmicos estimados para β -galactosidase imobilizada em sílica

Temperatura	k_d (h^{-1})	E_a ($kJ.mol^{-1}$)	ΔH ($kJ.mol^{-1}$)	ΔG ($kJ.mol^{-1}$)	ΔS ($kJ.mol^{-1}$)
20	0,021805	122,43	119,99	73,35	0,1591
30	0,086902		119,91	72,28	0,1571
40	0,688578		119,83	69,19	0,1617
45	0,900104		119,78	69,54	0,1580

A entalpia fornece as informações sobre variações do calor, enquanto a entropia prevê a desordem do sistema, essas duas variáveis fornecem o número de ligações não covalentes e o distúrbio da formação do estado de transição. Por meio dos valores calculados para entalpia (ΔH) observa-se diferenças pequenas ($<0,1\%$) com o aumento das temperaturas. Levando ao entendimento, que a entalpia não foi fortemente influenciada pelas temperaturas avaliadas (20 a 45 °C). Para a entropia (ΔS), os valores obtidos também apresentaram diferenças bem baixas na ordem de 0,46%. De forma geral, a entropia ($\Delta S > 0$) deveria aumentar com o aumento da temperatura, devido a agitação das moléculas, porém como não houve grande diferença entre os resultados, observa-se que as temperaturas utilizadas não afetaram a desordem das moléculas. Valores de ΔS próximos a zero, mostram que a inativação térmica da enzima não gerou qualquer alteração na estrutura terciária da proteína (USTOK; TARI; HARSA, 2010; CAMPELLO et al., 2012).

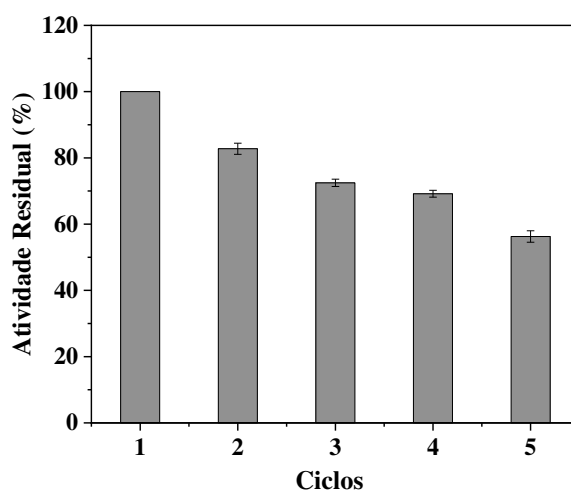
Campello et al. (2012) avaliaram os parâmetros termodinâmicos para β -galactosidase de *K. lactis* imobilizada, utilizando como suporte Eupergit® C. Para as temperaturas de 35, 40 e 45 °C não foram registradas diferenças significativas nos valores de ΔH e ΔS , corroborando com os resultados obtidos para β -galactosidase imobilizada em sílica.

A energia livre de Gibbs (ΔG) variou entre 69,19 a 73,35 kJ.mol⁻¹. Sendo que, ocorreu uma redução da ΔG da temperatura de 30 a 40 °C, depois para 45 °C aumentou 0,35 kJ.mol⁻¹. Nas enzimas a ΔG é diferente na estrutura nativa e desnaturada, e mostra o valor referente à preservação da conformação inicial ativa. Quando se observa a redução na ΔG , pode associar a desnaturação que muda a conformação da enzima, alterando a disponibilidade de sítios ativos (CAMPELLO et al., 2012; HEIDTMANN et al., 2012).

4.4.5 Reutilização da enzima imobilizada

A reutilização da enzima β -galactosidase comercial imobilizada na hidrólise da lactose foi avaliada em 5 ciclos de 25 minutos cada e são mostrados na Figura 4.15.

Figura 4.15 - Avaliação da reutilização da β -galactosidase (Lactozyme[®] 2600 L) imobilizada em sílica



É possível observar que a β -galactosidase imobilizada manteve sua atividade inicial superior a 70% durante quatro ciclos, chegando a cinco ciclos com 56% da sua atividade inicial. Para aplicação industrial a reutilização é uma característica considerável, pois quanto mais ciclos de utilização as enzimas puderem passar sem sofrer reduções em suas atividades, mais vantajoso será. Considerando que é possível utilizar a mesma enzima repetidas vezes com uma quantidade relevante de atividade enzimática. É possível realizar um processo menos oneroso haja vista o alto valor agregado das enzimas.

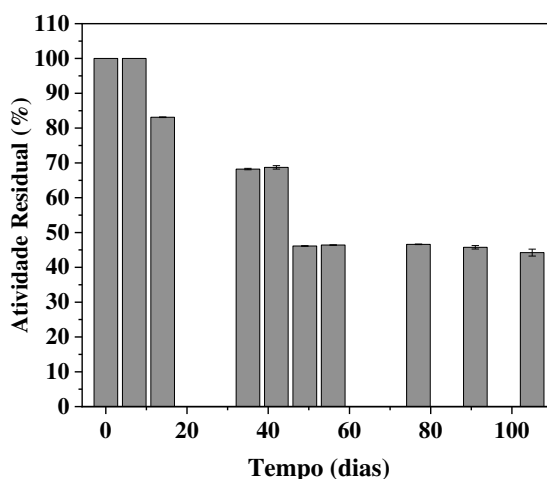
Os resultados se aproximam dos obtidos por Beniwal et al. (2018) que obtiveram uma atividade residual de cerca de 70% em 6 ciclos de reutilização de β -galactosidase (*K. lactis*)

imobilizada em nanopartículas de dióxido de silício. Lima et al. (2021) avaliaram o reuso de β -galactosidase (*K. lactis*) imobilizada em quitosana ativada com genipina. A hidrólise de leite UHT foi realizada em 5 ciclos. Em 4 ciclos foi constatada a eficiência da enzima imobilizada, sendo formada 96 mg.dL^{-1} de glicose. Eles relacionaram a possibilidade de reutilização com a rigidez da fixação da enzima no suporte.

4.4.6 Estabilidade ao armazenamento da enzima imobilizada

A estabilidade da β -galactosidase comercial imobilizada foi avaliada por 105 dias, a Figura 4.16 mostra a atividade residual em função do tempo de armazenamento da enzima.

Figura 4.16 - Estabilidade ao armazenamento da β -galactosidase (Lactozyme® 2600 L) imobilizada em sílica, mantida sob refrigeração (8°C)



A enzima imobilizada manteve cerca de 80% da sua atividade inicial em 15 dias, em seguida apresentou uma redução até 45 dias, mantendo 70% da atividade inicial. Ao final dos 105 dias de acompanhamento, a atividade inicial mantida foi de cerca de 44%, esse valor foi alcançado em torno de 50 dias e se manteve. A enzima apresentou uma boa estabilidade ao armazenamento, tendo uma atividade alta até 45 dias (70%), o armazenamento é importante visando a aplicação industrial, necessidade de transporte dentre outras ocorrências que podem ser úteis nos processos. Esses resultados corroboram com os obtidos por Tizchang et al. (2020), que conseguiram em 45 dias de armazenamento da β -galactosidase (*Bifidobacterium bifidum*) imobilizada em nanopartículas de dióxido de silício uma retenção da atividade de 65,59%.

A ligação covalente promove forte ligação da enzima ao suporte e uma das suas vantagens é a difícil perda da enzima por lixiviação o que seria benéfico pensando no armazenamento, entretanto é necessário avaliar a atividade, uma vez que a enzima pode estar retida, mas sem atividade. Nesse caso a ligação covalente foi eficiente e a enzima não se desprende nem apresentou perda expressiva de atividade em 45 dias de armazenamento.

Jochems et al. (2011) avaliaram a estocagem da β -galactosidase livre e imobilizada por adsorção em membrana de matriz mista com dióxido de zircônio a 5 °C. Eles alcançaram uma retenção de atividade de 60% em 7 dias de armazenamento para a enzima imobilizada, enquanto a enzima livre reteve apenas 46% da sua atividade inicial. Em 14 dias a enzima imobilizada manteve 41% da atividade enzimática. O processo de adsorção pode justificar a menor estabilidade ao armazenamento quando comparado aos resultados obtidos empregando a ligação covalente como método de imobilização. Contudo, quando se fala de imobilização de enzimas todas as variáveis devem ser analisadas, não somente o método, mas também o suporte e as características da enzima.

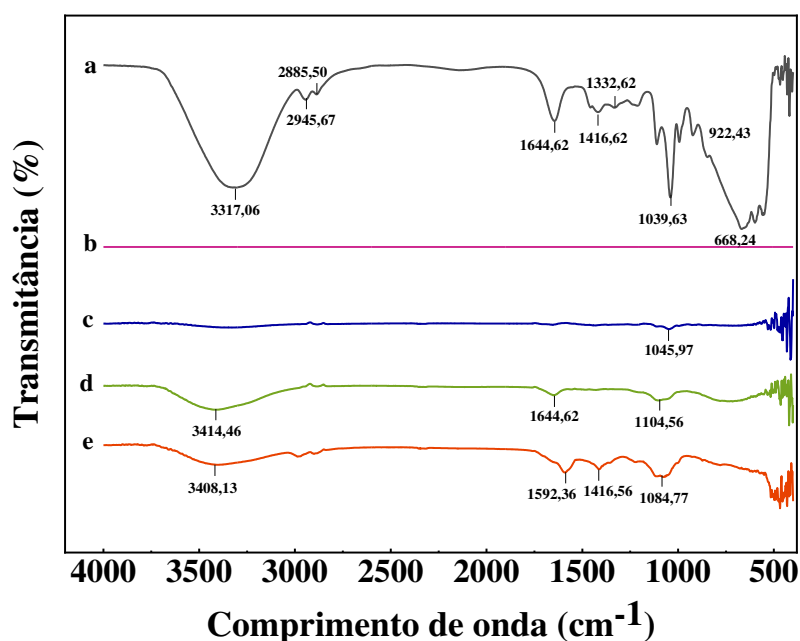
4.4.7 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR)

A espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) mostra a presença de grupos funcionais por meio dos espectros produzidos. Ela vem sendo bastante utilizada em processos de imobilização de enzimas, por deixar o processo de ligação mais claro, evidenciando as ligações entre enzima e suporte. A Figura 4.17 apresenta os espectros do FT-IR para as sílicas utilizadas na imobilização da β -galactosidase e também da enzima e a enzima imobilizada na sílica.

De acordo com a Figura 4.17, pode-se observar os diferentes espectros para cada uma das amostras. Na letra (a), tem-se a Lactozyme® 2600 L, a forte vibração da banda em torno de $3317,06\text{ cm}^{-1}$ pode ser atribuída aos grupos -OH e -NH, presentes na molécula da β -galactosidase. A banda de 3000 e 3500 cm^{-1} também pode ser observada na letra (d) que corresponde a ligação da sílica com o APTES e o glutaraldeído e na letra (e) que representa β -galactosidase imobilizada na sílica. Nesse caso, a vibração é menor, do que quando comparada com a enzima livre (a). Ainda para a enzima, é possível identificar bandas com menor vibração entre $2945,67$ a $2885,50\text{ cm}^{-1}$ que correspondem aos grupos -CH₃, em $1644,62\text{ cm}^{-1}$ identifica a região do grupo amida primária obtido por dobramento, para a bandas em $1416,62$ observa a presença de -CH, entre $1332,62$ a $1039,63\text{ cm}^{-1}$ e $922,43$ a $668,24$ existem ligações do tipo C-O (PAVIA et al., 2015; TIZCHANG et al., 2020).

Na letra (b), amostra de sílica pura não ficou evidente nenhuma banda. Para a letra (c) sílica com APTES observa-se uma pequena vibração em $1045,97\text{ cm}^{-1}$ que corresponde ligações do tipo C-O, devido a ligação da sílica com o APTES. A sílica com APTES e glutaraldeído (d) em $1644,62\text{ cm}^{-1}$ identifica o grupo amida primária e em $1104,56\text{ cm}^{-1}$ ligações do tipo C-O. O biocatalisador imobilizado (e) foram identificadas mais bandas que evidenciam a imobilização, em $1592,36\text{ cm}^{-1}$ têm-se o grupamento amina e amida primária da ligação entre enzima e suporte, em $1416,56\text{ cm}^{-1}$ ligação do tipo -CH e em $1084,77\text{ cm}^{-1}$ ligações C-O (PAVIA et al., 2015; TIZCHANG et al., 2020).

Figura 4.17 - Espectroscopia de infravermelho com transformadas de Fourier (FT-IR) a) Lactozyme[®] 2600 L; b) Sílica; c) Sílica com APTES; d) Sílica com APTES e glutaraldeído; e) β -galactosidase (Lactozyme[®] 2600 L) imobilizada em sílica.



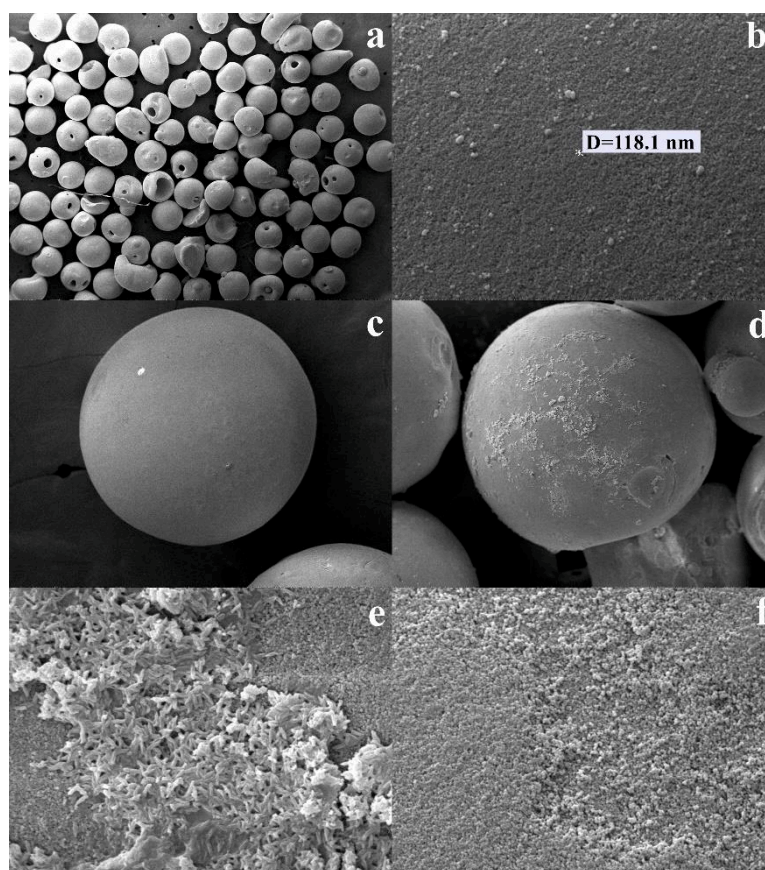
Tizchang et al. (2020) utilizaram o FT-IR para analisarem amostras de sílica ativada com glutaraldeído e β -galactosidase (*Bifidobacterium bifidum*) imobilizada em sílica, os resultados obtidos apresentaram alguns espectros similares aos visualizados na Figura 4.17. Souza et al. (2019) também avaliaram espectros de FT-IR obtidos para β -galactosidase (*Aspergillus oryzae*) imobilizada em alginato, conseguiram identificar espectros para a enzima e algumas diferenças quando esta estava envolvida em alginato, essas modificações também foram observadas para β -galactosidase imobilizada em sílica, isso se deve ao processo de

imobilização que gera ligações do suporte na enzima, modificando a característica dos grupos ligantes.

4.4.8 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi utilizada para ilustrar de forma mais real a estrutura da sílica, os agentes que ativaram esse suporte e também o biocatalisador imobilizado. A Figura 4.18 mostra as imagens obtidas para cada uma das amostras.

Figura 4.18 - Imagens do MEV (a) sílica pura - 200 μm , 50 X; (b) sílica com APTES 0,6% e glutaraldeído 6,86% - 1 μm , 20.00 K X; (c) sílica com APTES 0,6% e glutaraldeído 6,86% - 100 μm , 400 X; (d) β -galactosidase imobilizada em sílica funcionalizada e ativada - 100 μm , 400 X, (e) e (f) β -galactosidase imobilizada em sílica funcionalizada e ativada - 1 μm , 20.00 K X.



Fonte: A Autora

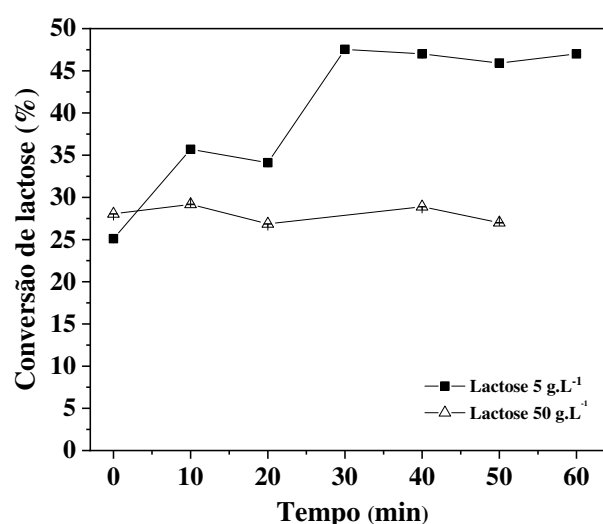
As imagens obtidas mostram a estrutura das amostras, na imagem (a) pode-se observar a característica da sílica pura sem nenhum tratamento, ela possui forma arredondada e irregular. Nas imagens (b) e (c) a amostra da sílica com APTES e glutaraldeído é observada, entretanto

não há nenhuma diferença aparente em relação a sílica pura. O diâmetro da sílica foi medido, e o valor obtido foi 118,1 nm. Em (d), (e) e (f), são ilustradas a β -galactosidase (Lactozyme[®] 2600 L) imobilizada em sílica. Comparando a imagem (d) com a (c) nota-se uma diferença. Na imagem (d) são evidenciados alguns relevos em toda estrutura da sílica, que podem estar associados a presença da β -galactosidase. Em (e) e (f) as imagens são bem diferentes das avaliadas anteriormente, entretanto não se pode afirmar com certeza que seja a enzima aderida à sílica.

4.5 HIDRÓLISE DA LACTOSE EM LEITO FIXO

A utilização do sistema contínuo com leito fixo é interessante pensando na produção em grande escala. Na Figura 4.19 são apresentados os resultados obtidos da conversão de lactose, com um leito fixo empacotado com β -galactosidase (Lactozyme[®] 2600 L) imobilizada em sílica.

Figura 4.19 - Conversão da lactose em reator de leito fixo empacotado com β -galactosidase (Lactozyme[®] 2600 L) imobilizada em sílica



A reação ocorreu em regime contínuo com escoamento ascendente. A conversão de lactose apresentou algumas diferenças com a alimentação de solução de lactose 5 e 50 g.L⁻¹. Para a solução menos concentrada (5 g.L⁻¹) a conversão iniciou em 25%, sendo crescente até 30 min de processo, chegando a uma conversão de 47,53%. Com uma maior concentração de lactose (50 g.L⁻¹) a conversão iniciou em 35% e manteve-se praticamente constante até 50 min

de reação. A conversão máxima de lactose foi em 10 min, sendo de 36,25%. A concentração da solução de alimentação levou a uma diferença na conversão de lactose, sendo que para a solução menos concentrada 5 g.L⁻¹ a conversão máxima foi 11,28% maior do que a máxima conversão para a solução em 50 g.L⁻¹.

Para a solução de 5 g.L⁻¹ a conversão em 60 min permaneceu em cerca de 47%, sendo observado que após os 30 min de reação a conversão permanece praticamente constante, o que mostra que o sistema entra em estado estacionário. Ricardi et al. (2018) também utilizaram um reator de leito fixo com β -galactosidase imobilizada em sílica e quitosana. A estabilidade operacional da enzima foi avaliada e alcançaram uma conversão de lactose inferior a obtida neste trabalho, a conversão foi de 14%.

A hidrólise da lactose em leito fixo se mostrou promissora para aplicação com a enzima imobilizada em sílica, entretanto se faz necessário um aprofundamento das condições do processo, prevendo também um aumento de escala. Na literatura estudos foram bem promissores na aplicação de β -galactosidase em leito fixo. Fischer et al. (2013) avaliaram a hidrólise da lactose com β -galactosidase de *A. oryzae* imobilizada em resina Duolite® A-568. Com uma alimentação de solução de lactose a 50 g.L⁻¹ alcançaram conversão de lactose de até 65%. Os resultados foram importantes para mostrar o potencial do leito fixo com β -galactosidase em sílica, para posterior aplicação na síntese dos galacto-oligossacarídeos, que é o principal objetivo do estudo.

4.6 AVALIAÇÃO DA IMOBILIZAÇÃO DE β -GALACTOSIDASE PRODUZIDA POR *Kluyveromyces marxianus*

4.6.1 Imobilização do extrato enzimático bruto obtido por *K. marxianus* em sílica

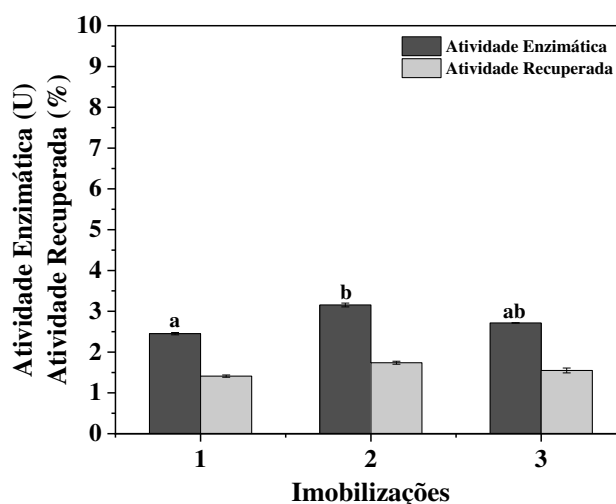
Por meio de fermentação submersa da *K. marxianus* obteve-se o extrato bruto enzimático, não purificado. Foi realizada a imobilização desse extrato em sílica e os resultados obtidos mostraram baixa ligação da enzima à sílica. Ofertando um extrato enzimático com atividade inicial de 190,08 U em 0,1 g de sílica, foi obtido uma atividade da enzima imobilizada de $2,07 \pm 0,54$ U ou $20,7 \pm 0,54$ U.g⁻¹ e uma atividade recuperada (AR) de $1,08 \pm 0,45$ %. Comparando esses resultados com os obtidos no item 4.2, nota-se uma diferença muito grande de cerca de vinte vezes maior, na mesma condição obteve-se atividade da enzima imobilizada de 44,67 U e atividade recuperada de 28,61% para o biocatalisador obtido com a enzima comercial.

Também foi avaliado o uso de uma quantidade maior de suporte, 0,5 g de sílica. Com uma oferta inicial de 140,86 U, obteve-se uma atividade enzimática da enzima imobilizada de $14,68 \pm 4,62$ U ou $29,36 \pm 4,62$ U.g⁻¹ e uma atividade recuperada de $10,42 \pm 13,60$ %, com uma massa maior de sílica têm-se uma atividade enzimática da enzima imobilizada maior, mas que continua distante do valor obtido na análise da comercial (44,67 U) utilizando apenas 0,1 g de sílica. Diante dessa discrepância dos resultados da enzima produzida por *K. marxianus* e a enzima comercial (Lactozyme® 2600 L), foram conduzidos testes utilizando uma imobilização em série.

4.6.1.1 Imobilização em série

A imobilização em série propôs uma sequência de imobilizações com o extrato bruto obtido da *K. marxianus*, utilizando em cada etapa uma nova massa de sílica (0,1 g). A Figura 4.20 apresenta a atividade enzimática da enzima imobilizada e a atividade recuperada obtida em cada série de imobilização.

Figura 4.20 - Imobilização em três etapas seriadas da β -galactosidase produzida por *K. marxianus*.



Nota-se na Figura 4.20, que tanto a atividade enzimática da enzima imobilizada como a atividade recuperada passam por uma pequena elevação da primeira imobilização para a segunda, depois observa-se uma redução para a terceira imobilização em comparação a anterior. Aplicando o teste de Tukey para analisar a diferença entre médias da atividade da enzima imobilizada observa-se que não há diferença significativa entre as amostras 1 e 3 e a amostra 2

não se diferencia estatisticamente da amostra 3. Os testes consideraram um nível de significância de 95%. Para a atividade recuperada não foi possível aplicar o teste de Tukey, pois o F calculado pelo teste de ANOVA foi não significativo, ou seja, foi menor que o F crítico, sendo assim considera-se que não há diferença entre as médias.

Sousa et al. (2021) propôs essa imobilização seriada e justificou o aumento na segunda imobilização como a possibilidade de um acréscimo de pureza do extrato enzimático bruto, considerando que produtos indesejáveis poderiam ter sido retidos na primeira imobilização. Contudo, mesmo com as três imobilizações seriadas não foi possível obter valores próximos ao da enzima comercial (Lactozyme[®] 2600 L) imobilizada em sílica, que foi de 44,67 U para atividade enzimática da enzima imobilizada. A imobilização seriada levou a atividades enzimáticas próximas a 3,0 U, mesmo utilizando uma quantidade de suporte três vezes maior.

4.7 AVALIAÇÃO DA PURIFICAÇÃO PARCIAL DA β -GALACTOSIDASE PRODUZIDA POR *Kluyveromyces marxianus*

Com o extrato bruto enzimático produzido por *K. marxianus* não foi possível obter imobilizações tão boas como obtido para a β -galactosidase (Lactozyme[®] 2600 L) comercial e purificada, então optou por avaliar algumas técnicas de purificação na tentativa de melhorar o processo de imobilização por ligação covalente em sílica.

4.7.1 Avaliação da ligação do extrato bruto enzimático em Duolite A-568 em leito fixo como estratégia de purificação parcial

Realizando adsorção em leito fixo com Duolite[®] A-568, observou-se uma redução no volume de alimentação (36 mL) para o volume final na saída do reator (23,5 mL), essa diferença de 12,5 mL é o valor retido na resina empacotada no leito fixo. Analisando a atividade enzimática do extrato bruto produzido na alimentação do reator e na saída, obteve-se $18,72 \pm 0,02$ e $5,06 \pm 0,02$ U.mL⁻¹, respectivamente. Como pode ser observado teve uma redução de 13,66 U.mL⁻¹, que pode estar associado à β -galactosidase adsorvida na resina ou mesmo inativada durante o processo.

O extrato enzimático da saída do reator foi imobilizado em sílica ativada. O valor inicial de atividade enzimática ofertada foi de $26,18 \pm 0,02$ U, sendo obtido uma atividade do biocatalisador imobilizado de $0,55 \pm 0,03$ U e uma atividade recuperada de imobilização de 2,12%. Comparando esses resultados com os valores da imobilização do extrato bruto sem

nenhum tratamento (2,07 U) apresentado no item 4.6.1, não foi observado melhorias na imobilização, mas sim redução na quantidade de enzima imobilizada.

Considerando que boa parte da enzima ficou adsorvida na resina Duolite® A-568 conduziu o processo de dessorção da enzima em tampão fosfato de potássio a pH 7,3 e pH 5,6. Ao final do processo obteve-se atividade enzimática de apenas $0,11 \pm 0,002$ U para pH 7,3 e 0,0 U para pH 5,6. A utilização da Adsorção em Duolite® A-568 em leito fixo como estratégia de purificação não se mostrou adequada dado os resultados de redução na quantidade de enzima imobilizada em detrimento ao aumento esperado após purificação.

4.7.2 Diálise do extrato bruto enzimático

Aplicando o processo de diálise foi observado uma redução da atividade enzimática do extrato bruto produzido. Os valores iniciais dos extratos foram $270,78 \pm 0,07$ U e $227,5 \pm 0,02$ U, esses valores foram reduzidos para $177,63 \pm 0,05$ U e $153,96 \pm 0,02$ U, respectivamente. Após a diálise foi conduzido a imobilização direta e a imobilização após o processo de liofilização. Os resultados são apresentados na Tabela 4.10.

Tabela 4.10 - Avaliação da imobilização de β -galactosidase produzida por *K. marxianus* dialisada e liofilizada em sílica

Tipo de extrato enzimático	Atividade enzimática inicial ofertada (U)	Atividade do biocatalisador imobilizado (U)	Atividade Recuperada (%)
Extrato enzimático dialisado	$153,96 \pm 0,02$	$4,76^a \pm 0,003$	$3,09^a \pm 0,003$
Extrato enzimático dialisado e liofilizado	$81,07 \pm 0,01$	$3,35^b \pm 0,002$	$4,13^b \pm 0,002$

As letras diferentes indicam que há diferença significativa entre as médias ($p < 0,05$)

Pode-se observar que as imobilizações com extrato enzimático dialisado e dialisado e liofilizado, apresentaram valores próximos de imobilização, para o dialisado a atividade enzimática foi de $4,76 \pm 0,003$ U e para o dialisado e liofilizado $3,35 \pm 0,002$ U, sendo a diferença entre eles de apenas 1,41 U. Entretanto, aplicando teste t de Student observa-se que há diferença estatística em $p < 0,05$ tanto para atividade do biocatalisador imobilizado como para atividade recuperada. As atividades iniciais foram diferentes, o que aparentemente não afetou

o resultado da imobilização, podendo considerar a saturação do suporte de imobilização. Comparando os resultados obtidos com os do extrato bruto (item 4.6.1) sem nenhum tratamento, nota-se que a atividade enzimática na enzima imobilizada dobrou para o extrato bruto dialisado. Sem tratamento a atividade enzimática era de 2,07 U, com a diálise a atividade enzimática no biocatalisador imobilizado foi em torno de 4,00 U. Pode-se dizer que a diálise conseguiu separar algumas impurezas que poderiam afetar o processo de imobilização em sílica, porém não foi tão eficiente para conseguir atividade enzimáticas em torno de 45,00 U, valor alcançado para β -galactosidase comercial (Lactozyme[®] 2600 L).

A diálise é bastante utilizada como estratégia de purificação de enzimas, contudo ela é aplicada em conjunto com outras técnicas e tem gerado bons resultados. Silva (2008), avaliou a purificação da enzima bromelina realizando a diálise como uma etapa preliminar. A diálise foi eficiente para aumentar o fator de purificação em três vezes.

4.7.3 Precipitação com sal seguida de diálise

O sulfato de amônio foi utilizado para a precipitação e em seguida foi realizado a diálise. A amostra apresentou as mesmas características das amostras dialisadas no item 4.7.2. Uma redução da atividade enzimática foi observada. Inicialmente o extrato bruto apresentava atividade enzimática de $215,18 \pm 0,004$ U, após o processo a atividade enzimática caiu para $167,11 \pm 0,004$ U. Tal fato pode ser avaliado como inativação de parte enzimática ou mesmo uma diluição da amostra na solução da diálise.

Após a precipitação seguida de diálise foi feita a imobilização em sílica de duas formas: com o extrato enzimático precipitado e dialisado e com o extrato enzimático precipitado, dialisado seguido de liofilização. Na Tabela 4.11 é possível observar os valores alcançados.

O valor de atividade enzimática ofertado nas duas imobilizações foi diferente, sendo maior para o extrato enzimático após precipitação e diálise. Mesmo com as diferenças nas atividades ofertadas na imobilização, os valores das atividades enzimáticas dos biocatalisadores imobilizados foram próximos. Contudo, o teste t de Student mostra que há diferença estatística entre as duas amostras em $p < 0,05$. O extrato enzimático após precipitação e diálise apresentou atividade enzimática 0,51 U superior ao extrato obtido com a etapa de liofilização. A atividade recuperada também foi maior para a amostra que passou apenas por diálise. Os valores obtidos pelas duas situações foram próximos aos apresentados para os extratos enzimáticos brutos dialisados (item 4.7.2). Entretanto, é um processo mais demorado e trabalhoso.

Tabela 4.11 - Avaliação da imobilização de β -galactosidase produzida por *K. marxianus* precipitada com sulfato de amônio, dialisada e liofilizada

Amostra	Atividade enzimática inicial ofertada (U)	Atividade do biocatalisador imobilizado (U)	Atividade Recuperada (%)
Extrato enzimático após precipitação e diálise	25,41 $\pm$ 0,011	3,47 ^a $\pm$ 0,001	13,66 ^a $\pm$ 0,001
Extrato enzimático após precipitação, diálise e liofilização	63,33 $\pm$ 0,007	2,96 ^b $\pm$ 0,006	4,67 ^b $\pm$ 0,006

As letras diferentes indicam que há diferença significativa entre as médias ($p < 0,05$)

Vários estudos utilizam a precipitação com sulfato de amônio seguida de diálise como uma metodologia de purificação de enzimas. Porém, na maioria dos casos tanto a diálise como precipitação são etapas preliminares para aplicação de técnicas mais específicas de purificação. Vidya et al. (2020) avaliaram a purificação de β -galactosidase de *Aspergillus terreus* utilizando precipitação com sulfato de amônio, diálise, cromatografia em coluna DEAE de celulose e cromatografia de filtração em gel. Com todas as etapas foi alcançado uma purificação de 10,78 vezes. Porém, analisando até a etapa de precipitação e diálise foi observado um fator de purificação de 3,78 vezes, tendo a β -galactosidase uma atividade específica de 21,9 U.mg⁻¹. Comparando os resultados com os obtidos para a β -galactosidase de *K. marxianus* observa-se que a precipitação pode sim contribuir para a pureza da enzima, entretanto, esse estudo deve ser aprofundado para conseguir identificar a enzima presente com técnicas mais específicas.

Ainda assim, comparando os resultados da imobilização em sílica do extrato bruto enzimático (2,07 U) e do extrato precipitado seguido de diálise (3,47 U), observa-se que houve um efeito da estratégia de purificação, sendo capaz de aumentar a retenção de enzima na sílica. O aumento foi de 1,4 U, ainda que pequeno a purificação é algo difícil e oneroso na produção de enzimas, logo, qualquer indício de melhora deve ser considerado.

4.7.4 Utilização das resinas AMBERLITE XAD761[®] e AMBERJET[™] 4200 Cl como estratégias de purificação parcial do extrato bruto enzimático

Utilizou-se as resinas de adsorção como estratégia de purificação, considerando tanto que elas poderiam reter a enzima, e depois removê-las por dessorção, ou mesmo remover impurezas do meio, deixando um sobrenadante mais puro.

Para a resina Amberlite XAD-761[®] a atividade enzimática média determinada na resina foi de $1,17 \pm 0,19$ U ofertando $92,00 \pm 0,003$ U. A retenção na resina foi baixa, sendo assim inviável a recuperação do que ficou retido por dessorção. Porém, utilizou o sobrenadante com atividade enzimática de 43,45 U resultante para avaliar o processo de imobilização em sílica. Da imobilização em sílica obteve-se atividade enzimática da enzima imobilizada de $1,74 \pm 0,05$ U, obtendo uma atividade recuperada de $3,97 \pm 0,86\%$, esses valores mostraram uma baixa imobilização no suporte. Comparando a imobilização em sílica do sobrenadante do processo da Amberlite XAD-761[®] (1,74 U) e do extrato bruto sem nenhuma tentativa de purificação (2,07 U), observa-se que os resultados do primeiro processo foram inferiores e ineficientes como estratégia de purificação.

De forma similar, a resina Amberjet[™] 4200 Cl foi empregada com a possibilidade de promover a adsorção da enzima. Contudo, apresentou uma atividade enzimática média de $1,43 \pm 0,18$ U no biocatalisador imobilizado e atividade recuperada de $3,22 \pm 0,29\%$ valor bem pequeno, se comparado com a atividade do biocatalisador imobilizado com a enzima comercial (44,67 U). O sobrenadante resultante foi utilizado para verificar alguma melhoria na imobilização em sílica. Ofertando uma atividade inicial enzimática de $40,67 \pm 0,008$ U, obteve-se uma atividade da enzima imobilizada de $3,89 \pm 0,003$ U. Comparando esse valor com o obtido no item 4.6.1 para o extrato bruto sem nenhum tratamento (2,07 U), observa-se um aumento na atividade do biocatalisador imobilizado de aproximadamente 87,44%, sendo em termos de atividade um aumento de 1,89 U. Ainda assim, esse valor é inferior ao resultado alcançado com a imobilização da enzima comercial (44,67 U).

Dentre as duas resinas avaliadas a Amberjet[™] 4200 Cl foi a que apresentou os melhores resultados, porém é necessário aprofundar os estudos sobre a atuação da resina no extrato enzimático bruto, para ter certeza que o processo tem validade como uma estratégia de purificação da β -galactosidase.

4.7.5 Avaliação da Toyopearl® DEAE-650s como estratégia de purificação parcial do extrato enzimático bruto

O trocador aniônico Toyopearl® DEAE 650s fraco foi eficiente no processo de adsorção do extrato enzimático bruto da β -galactosidase, os resultados mostraram que com uma oferta enzimática inicial de $70,90 \pm 0,02$ U, obteve-se um biocatalisador imobilizado com atividade enzimática de $5,27 \pm 0,20$ U e uma atividade recuperada de $7,43 \pm 0,3\%$. Como na resina ficou retido uma quantidade maior de enzima, comparando com as outras estratégias de purificação analisadas, testes de dessorção foram conduzidos.

A dessorção da enzima foi realizada com cloreto de potássio a 0,1 M seguida de etapa de diálise para retirada do sal. A solução extraída da dessorção apresentou atividade enzimática média de $4,18 \pm 1,0$ U. O que mostra uma recuperação de 80,85% da enzima, considerando a atividade enzimática no suporte (5,27 U). Com a solução de dessorção realizou a imobilização em 0,1 g de sílica, porém o volume disponível era bem pequeno. A atividade enzimática inicial ofertada foi de apenas $2,68 \pm 1,0$ U ou $26,8 \text{ U.g}^{-1}$ de sílica. A atividade enzimática do biocatalisador imobilizada com essas condições foi de $0,38 \pm 0,04$ U ou $3,8 \text{ U.g}^{-1}$ de sílica. A atividade recuperada média foi de $14,04 \pm 1,65\%$. Os resultados com o Toyopearl® DEAE 650s se mostram promissores.

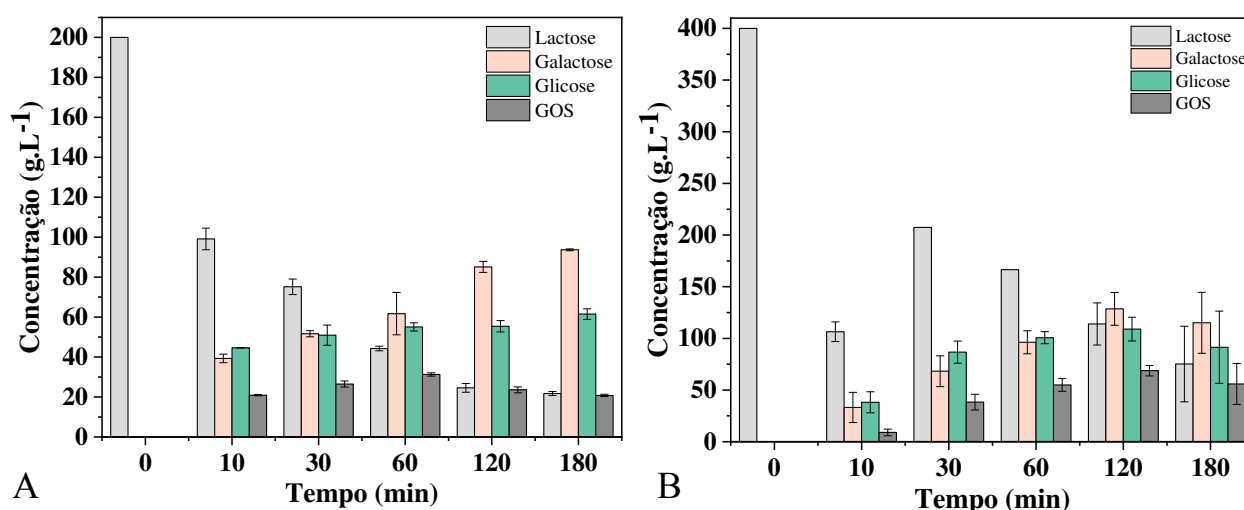
A resina Toyopearl® DEAE 650s é bastante aplicada em purificação de proteínas, entretanto em colunas cromatográficas. Kumura; Ishido; Shimazaki (2011) avaliaram a purificação de protease de *A. oryzae* em coluna cromatográfica, identificando três tipos de proteases, sendo que a Toyopearl® DEAE 650s foi capaz de adsorver o primeiro componente observado. Os resultados foram eficientes para identificar as proteases no estudo. Assim, observa-se que para a purificação em processos como o que foi realizado para β -galactosidase de *K. marxianus* mais estudos precisam ser conduzidos. Mesmo assim, é possível dizer que a resina é promissora como uma estratégia de purificação, podendo trazer bons resultados de recuperação.

4.8 SÍNTESE DOS GALACTO-OLIGOSSACARÍDEOS

4.8.1 Síntese dos galacto-oligossacarídeos com a enzima comercial (Lactozyme® 2600 L) livre e imobilizada

Os testes preliminares avaliaram inicialmente a síntese dos galacto-oligossacarídeos da enzima β -galactosidase comercial livre. Na Figura 4.21 observa-se a concentração de galacto-oligossacarídeos em função do tempo de reação, além dos outros produtos formados por hidrólise da lactose presente, para as concentrações iniciais de lactose de 200 e 400 g.L⁻¹ a 30 °C em tampão fosfato de potássio pH 7,0.

Figura 4.21 - Concentração de lactose, GOS, galactose e glicose produzidos com a Lactozyme® 2600 L solúvel (A) Lactose (200 g.L⁻¹); (B) Lactose (400 g.L⁻¹)



Por meio da Figura 4.21 (A), observa-se que com uma concentração inicial de lactose de 200 g.L⁻¹, a produção de GOS foi crescente até 60 min, chegando a uma concentração de 31,27 g.L⁻¹ e sofreu leve redução até 180 min (20,8 g.L⁻¹), o que é esperado pois, a reação de transgalactosilação é competitiva com a hidrólise da lactose. Logo, também se nota a formação de galactose e glicose, suas concentrações foram maiores nos tempos finais da reação e com essa maior taxa de hidrólise da lactose observa a redução na produção dos GOS, nos tempos de 120 e 180 min. A conversão da lactose foi de 89,14% ao final da reação.

Com a concentração inicial de 400 g.L⁻¹, na Figura 4.21 (B), a produção de GOS também foi crescente em função tempo, porém foi até o tempo de 120 min, alcançando uma concentração de 68,70 g.L⁻¹, a reação de hidrólise da lactose também foi observada, com uma

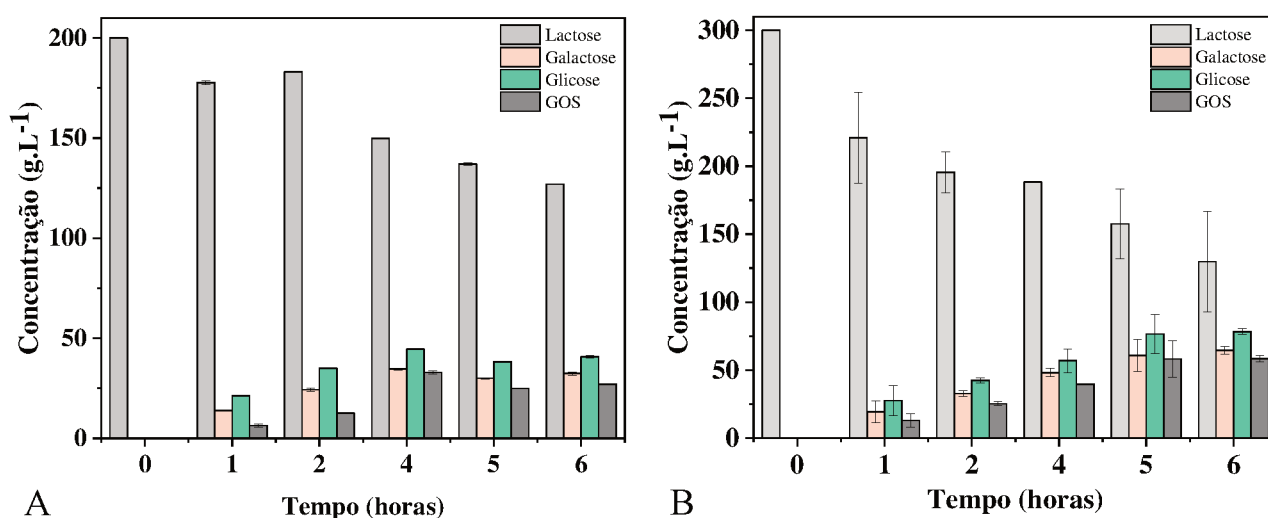
conversão de 74,73%. Observa-se também uma redução na concentração de lactose no tempo de 10 min, isso pode ser explicado devido a não solubilidade da lactose em altas concentrações nos tempos iniciais da reação.

Um meio rico em lactose favorece a produção dos GOS, uma vez que a lactose será o aceptor realizando a reação de transgalactosilação, que dá origem aos GOS (MARTINS; BURKET, 2009; FAI; PASTORE, 2015). Essa característica fica evidente comparando as concentrações iniciais do meio e as concentrações máximas de GOS, com 200 g.L⁻¹ produziu 31,27 g.L⁻¹ de GOS e com 400 g.L⁻¹ 68,70 g.L⁻¹, o valor mais que duplicou (2,2x). O mesmo comportamento foi observado por Carevic et al. (2018) que avaliaram a produção de GOS com β -galactosidase de *L. acidophilus*. A concentração de lactose foi variada de 50 a 450 g.L⁻¹, alcançaram os melhores rendimentos na maior concentração (450 g.L⁻¹), observando um rendimento crescente com o aumento de lactose.

Outro fator importante na síntese dos GOS é o tempo de reação, pois como foi observado na Figura 4.21 (A) e (B) a formação dos GOS é crescente até certo ponto, sendo que na sequência pode acontecer perdas na concentração dos GOS, uma vez que podem ser substratos na reação de hidrólise (LISBOA et al., 2012; PANESAR et al., 2018).

A produção dos GOS também foi avaliada com β -galactosidase comercial imobilizada em sílica, nas condições previamente otimizadas. A Figura 4.22 ilustra a formação dos GOS.

Figura 4.22 - Concentração de lactose, GOS, galactose e glicose produzidos com a Lactozyme® 2600 L imobilizada em sílica (A) Lactose (200 g.L⁻¹); (B) Lactose (300 g.L⁻¹)



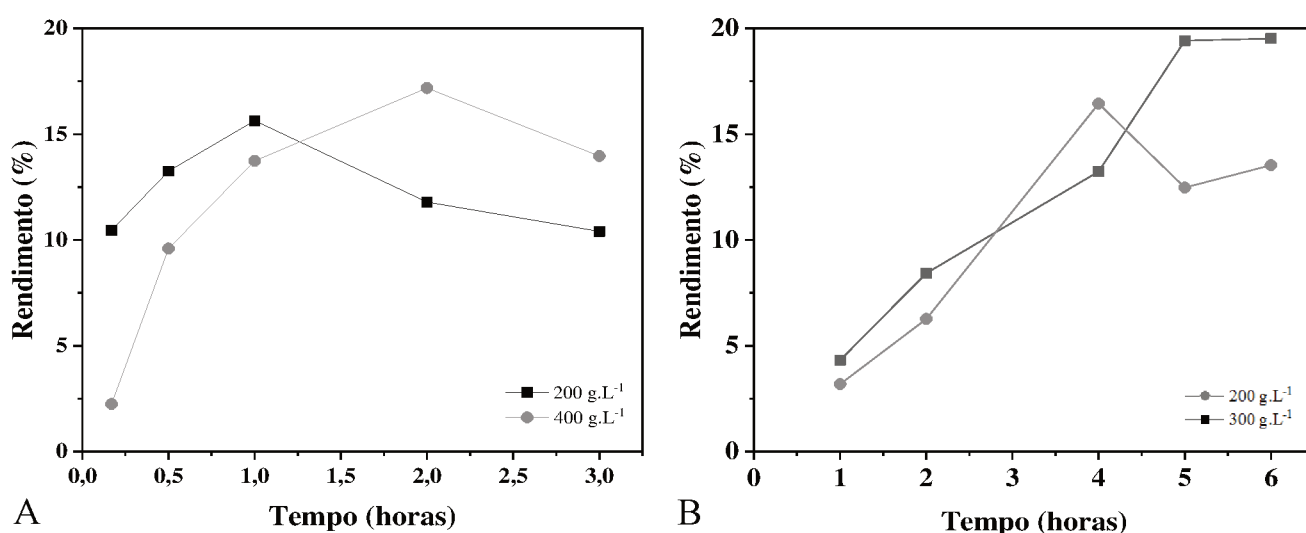
Para β -galactosidase imobilizada em sílica, foi utilizado um tempo maior de reação, pois foi constatado que a produção dos GOS era mais lenta do que com a enzima em sua forma livre,

a imobilização modifica a conformação da enzima, ocasionando diferenças nas reações. Na Figura 4.22 (A), com concentração inicial de lactose de 200 g.L⁻¹ a produção de GOS foi crescente até o tempo de 4 h, chegando a uma concentração de 32,87 g.L⁻¹. Após 6 h de reação observou aumento na galactose e na glicose e redução nos GOS. A conversão de lactose foi de 36,53%. Para a concentração de lactose maior, 300 g.L⁻¹, Figura 4.22 (B) se observa que a produção dos GOS foi crescente até 6 h de reação com concentração de 58,53 g.L⁻¹ e a conversão de lactose foi de 56,73%.

Com a enzima imobilizada também foi observado um aumento na concentração dos GOS no meio com concentração inicial de lactose maior (300 g.L⁻¹). O incremento nos GOS foi de 1,78 vezes maior com um aumento de 50% na concentração inicial de lactose. O tempo de formação dos GOS foi mais lento, precisando de um maior tempo de reação (6 h).

Também foram calculados os rendimentos da produção de GOS, na Figura 4.23 são apresentados os rendimentos para a enzima livre e imobilizada em sílica em função do tempo de síntese dos GOS.

Figura 4.23 - Rendimento na síntese dos GOS (A) Rendimentos com Lactozyme® 2600 L livre; (B) Rendimentos com Lactozyme® 2600 L imobilizada em sílica



Como visualizado na Figura 4.23, os maiores rendimentos foram obtidos tanto para enzima livre (A), como para enzima imobilizada (B) nos meios com concentração inicial de lactose mais alta, 400 e 300 g.L⁻¹, respectivamente. Observando os rendimentos para enzima livre, Figura 4.23 (A), verifica que o rendimento máximo para os dois meios 200 e 400 g.L⁻¹ de lactose foi em 1 e 2 h, respectivamente. Após esse tempo, houve redução nesses valores. Os

valores máximos obtidos de rendimento foram de 15,63% para o meio com 200 g.L⁻¹ e 17,18% para o meio com 400 g.L⁻¹ de lactose.

Na Figura 4.23 (B), é possível notar que a produção dos GOS com a enzima imobilizada é mais lenta, foi necessária uma reação mais longa (6 h). Para o meio com 200 g.L⁻¹ o rendimento foi crescente até o tempo de 4 h (16,44%), em 5 e 6 h houve uma pequena redução chegando às 6 h com 13,53% de rendimento. Para o meio com 400 g.L⁻¹ o rendimento aumentou até 6 h, alcançando um valor de 19,51%.

Comparando os rendimentos de produção dos GOS com a enzima livre e imobilizada, observa-se que com uma concentração inicial de lactose de 200 g.L⁻¹ a enzima imobilizada apresentou maior rendimento, 16,44%, entretanto foi necessário 4 h de reação. Em concentrações iniciais de lactose maiores 400 g.L⁻¹ (enzima livre) e 300 g.L⁻¹ (enzima imobilizada) o maior rendimento foi para enzima imobilizada alcançando 19,51% em seis horas de reação. Os resultados se mostram promissores quando comparados com a literatura, Yin et al. (2017) estudaram a produção de GOS com três β -galactosidases e condições diferentes, obtidas por *Bacillus circulans* (pH 6,0 à 60 °C), *K. lactis* (pH 7,0 à 40 °C) e *A. Oryzae* (pH 4,5 à 45 °C), os rendimentos obtidos foram de 48,3%, 34,9% e 19,5%, respectivamente. Eskandarloo; Abbaspourrad (2018) avaliaram a produção de GOS com β -galactosidase de *A. oryzae* imobilizada em contas de vidro em reator de leito fixo, como fonte de lactose utilizaram permeado de soro de leite e obtiveram um rendimento máximo de 25,2% em 60 °C.

Diante do exposto, fica claro que a produção dos GOS deve ser em meio rico em lactose, considerando as melhores produções de GOS nas concentrações de 300 e 400 g.L⁻¹ de lactose. A reação com a enzima livre e imobilizada foi diferente em relação ao tempo de produção, sendo com a enzima imobilizada uma reação mais lenta. Também pode-se dizer que a β -galactosidase comercial (Lactozyme® 2600 L) imobilizada em sílica, tem potencial para síntese dos GOS, dessa forma a reação foi mais explorada com o objetivo de aumentar a produção e rendimento dos GOS.

4.8.2 Influência da força iônica do tampão na síntese dos galacto-oligossacarídeos com a enzima comercial (Lactozyme® 2600 L) imobilizada em sílica

A influência da força do tampão na reação de transgalactosilação para produção dos galacto-oligossacarídeos foi avaliada utilizando a β -galactosidase comercial imobilizada. Os resultados são apresentados na Tabela 4.12.

Tabela 4.12 - Influência da força iônica do tampão fosfato de potássio (pH 7,0) na concentração de galacto-oligosacarídeos, a 30 °C e concentração de lactose a 300 g.L⁻¹

Tempo (horas)	Concentração de GOS (g.L ⁻¹) em diferentes forças iônicas		
	0,05 M	0,1 M	0,2 M
2	12,37 ± 0,36	12,24 ± 4,25	13,15 ± 1,54
4	28,78 ± 5,84	29,60 ± 5,98	22,77 ± 2,22
6	44,63 ± 5,11	36,16 ± 5,53	33,45 ± 0,43
8	52,17 ± 1,65	45,15 ± 12,28	39,73 ± 1,45

Observa-se que a maior concentração de GOS obtida foi em 8 h para a força iônica do tampão de 0,05 M, sendo de 52,17 g.L⁻¹. No mesmo tempo a menor concentração obtida foi em 0,2 M, com 39,73 g.L⁻¹. Logo, observa-se que quanto maior a força iônica do tampão menor foi a concentração de GOS produzida para todos os tempos analisados. Não há muitos estudos sobre a avaliação da força iônica na produção de GOS, porém a maioria indica valores menores. Uma possível explicação para essa interferência, seria que ao aumentar a força iônica em uma solução com proteínas, no caso as enzimas, as cargas provenientes da dissociação do sal vão interagir com as cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos da proteína, o que diminui a interação entre as proteínas presentes e aumenta a solubilidade da enzima (*salting-in*) (DALA-PAULA et al., 2021). Esse fato pode reduzir a atividade enzimática e assim prejudicar a produção dos GOS. Porém, mais estudos são necessários sobre a real ação da força iônica.

Assim, optou por utilizar a força iônica de 0,05 M, contribuindo assim para a produção dos GOS. Outros estudos também utilizaram tampão com força iônica em 0,05 M (BOTVYNKO et al., 2019; RICO-RODRIGUES et al., 2020; FISCHER; KLEINSCHMIDT, 2021; YÁNEZ-ÑECO et al., 2021).

4.9 INFLUÊNCIA DA LACTOSE, AGITAÇÃO E TEMPERATURA NA PRODUÇÃO DE GALACTO-OLIGOSSACARÍDEOS COM β -GALACTOSIDASE COMERCIAL IMOBILIZADA EM SÍLICA

Os efeitos das variáveis, concentração de lactose, agitação e temperatura foram avaliados simultaneamente para concentração dos GOS, em um Planejamento Fatorial Fracionário 2⁴⁻¹ com três níveis para cada uma das variáveis, os resultados são apresentados na Tabela 4.13. Uma estimativa do principal efeito foi obtida com a avaliação da diferença no

desempenho do processo devido a uma mudança do nível mais baixo (–1) para o mais alto (+1) da variável correspondente.

Tabela 4.13 - Valores reais e os valores codificados (entre parênteses) e resultados experimentais obtido pelo Planejamento Fatorial Fracionário 2^{4-1} ensaios acrescidos de 3 pontos centrais para a síntese de GOS em tampão fosfato de potássio 0,05 M, pH 7,0

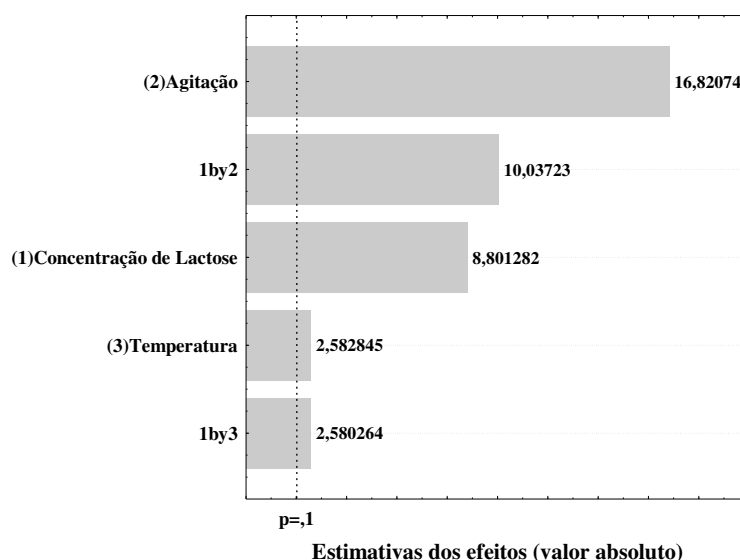
Experimento	Concentração de lactose (g.L ⁻¹)	Agitação (rpm)	Temperatura (°C)	GOS (g.L ⁻¹)	Rendimento (%)
1	200,00 (-1)	116,00 (-1)	30,00 (-1)	11,24	5,62
2	200,00 (-1)	116,00 (-1)	40,00 (+1)	13,56	6,78
3	200,00 (-1)	164,00 (+1)	30,00 (-1)	26,70	13,35
4	200,00 (-1)	164,00 (+1)	40,00 (+1)	24,39	12,20
5	400,00 (+1)	116,00 (-1)	30,00 (-1)	5,64	1,41
6	400,00 (+1)	116,00 (-1)	40,00 (+1)	14,36	3,59
7	400,00 (+1)	164,00 (+1)	30,00 (-1)	56,41	14,10
8	400,00 (+1)	164,00 (+1)	40,00 (+1)	67,70	16,93
9 (C)	300,00 (0)	140,00 (0)	35,00 (0)	29,01	9,67
10 (C)	300,00 (0)	140,00 (0)	35,00 (0)	32,67	10,89
11 (C)	300,00 (0)	140,00 (0)	35,00 (0)	30,73	10,24

A produção dos GOS foi conduzida em uma reação de 8 h, sendo nesse tempo obtidas as maiores concentrações de GOS. A atividade do biocatalisador imobilizado para as produções foi de $230 \pm 4,6$ U.g⁻¹. A concentração de GOS variou de 5,64 a 67,70 g.L⁻¹. O maior valor obtido foi em concentração de lactose de 400 g.L⁻¹, agitação de 164 rpm e temperatura de 40°C em tampão fosfato de potássio pH 7,0. O rendimento também foi calculado e variou de 1,41 a 16,93%. O maior valor obtido (16,93%) foi na mesma condição da maior concentração de GOS. Na Figura 4.24, são apresentados os efeitos que foram estatisticamente significativos em 90% na síntese dos GOS.

Os resultados mostram que as três variáveis avaliadas e o efeito conjunto entre concentração de lactose, agitação e concentração de lactose e temperatura apresentaram efeitos positivos, indicando que ao passar do nível –1 (menor valor) para o nível +1 (maior valor), haverá aumento na concentração de GOS. A agitação foi a variável que apresentou o efeito mais significativo na concentração dos GOS, tendo o efeito positivo médio de 16,82%, seguido do efeito conjunto da concentração de lactose e agitação, concentração de lactose, temperatura e

efeito conjunto de concentração de lactose e temperatura, todas com nível de significância de 0,10.

Figura 4.24 - Estimativas dos efeitos para concentração de lactose, agitação e temperatura na concentração dos GOS para o Planejamento Fatorial Fracionário 2^{4-1}



Lisboa et al. (2012) avaliaram a síntese de GOS com β -galactosidase de *K. lactis*, realizaram um planejamento fatorial variando a temperatura, concentração de enzima e lactose. Como resultados, também encontraram efeito positivo da concentração de lactose, sendo a produção dos GOS acentuada em 400 g.L^{-1} ($167,5 \text{ mg.mL}^{-1}$), corroborando com os resultados obtidos. O mesmo foi observado em outros estudos: Martínez-Villaluenga et al. (2008), afirmaram que a transgalactosilação aumentou significativamente com a elevação da concentração inicial de lactose de 150 a 350 g.L^{-1} . Sendo que a produção de dissacarídeos passou de 13% para 15,2% na concentração de lactose de 350 g.L^{-1} . Wang et al. (2021) alcançaram rendimento máximo de GOS utilizando concentração inicial de lactose em 50% (p.v⁻¹).

A temperatura também é um fator importante na produção dos GOS, uma vez que afeta a velocidade de reação, solubilidade da lactose e estabilidade da enzima (VERA et al., 2012; PANESAR et al., 2018). O efeito estimado para a temperatura foi positivo, indicando que um aumento, levou a maior concentração de GOS, sendo que na temperatura de 40°C foram obtidos os melhores valores para os GOS. Com o aumento da temperatura eleva-se a taxa de reação e a solubilidade da lactose, levando assim a uma maior produção de GOS, porém é

necessário considerar os efeitos na estabilidade da enzima, para que não ocorra perda de atividade da mesma.

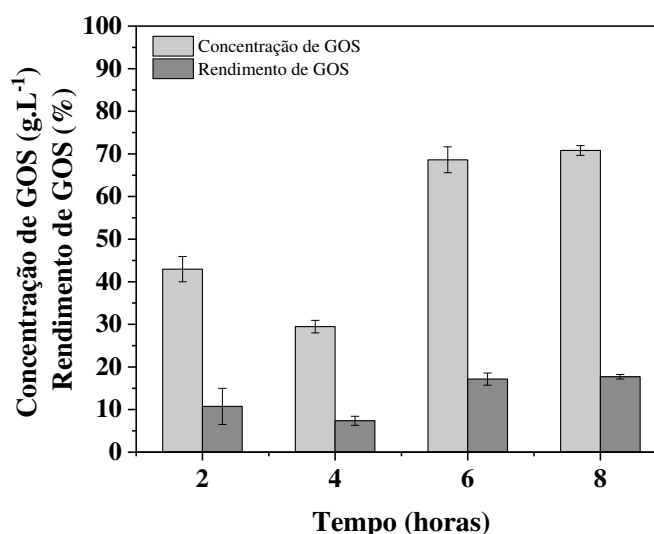
A agitação foi a variável que apresentou o maior efeito sob a produção dos GOS, mostrando relação direta na realização da transgalactosilação. Na literatura não são encontrados muitos estudos variando a agitação, entretanto a produção de GOS é na maioria das vezes realizada sob agitação constante, em muitos casos foram utilizados altas rotações, 120 rpm (SEM et al., 2014); 150 rpm (CAREVIC et al., 2018; CHANALIA et al., 2018) 180 rpm (LISBOA et al., 2012; CARDOSO et al., 2017) 200 rpm (MANO; PAULINO; PASTORE, 2019).

4.10 SÍNTESE DE GALACTO-OLIGOSSACARÍDEOS COM A ENZIMA COMERCIAL UTILIZANDO AGITAÇÃO MAGNÉTICA E MECÂNICA

4.10.1 Agitação magnética na síntese de galacto-oligossacarídeos

Foi avaliada a síntese dos GOS utilizando reator de mistura com agitação magnética. A condição tomada como referência foi aquela que implicou no melhor resultado do Planejamento Fatorial (item 4.9), porém aumentou a agitação, considerando que essa foi a variável mais significativa, passando de 164 rpm para 200 rpm. A atividade enzimática do biocatalisador imobilizado foi de 300,00 U.g⁻¹. O valor obtido de atividade foi maior que o utilizado no planejamento fatorial (230,00 U.g⁻¹), para reproduzir as condições dos experimentos do item 4.9 foi necessário utilizar uma quantidade maior de sílica de 0,3 g. A atividade enzimática não se manteve padrão, apresentando variação de 70,00 U.g⁻¹ a mais que o avaliado no item 4.9. Na Figura 4.25 são apresentados os resultados.

Figura 4.25 - Concentração e rendimento de GOS na síntese por agitação magnética em reator de mistura. Concentração de lactose 400 g.L⁻¹ a 40 °C e 200 rpm.



Com a agitação magnética observa-se que a maior concentração de GOS foi obtida no tempo de 8 horas, alcançando um valor de 70,81 g.L⁻¹. O maior rendimento também foi nesse tempo, sendo de 17,70%. Nesse tempo a conversão de lactose foi de 71,17%. Como foi definido no item 4.9 a agitação é uma variável com bastante relevância, sendo que os resultados indicaram que quanto mais elevada melhores os resultados para concentração de GOS. Uma comparação das concentrações de GOS pode ser feita entre os resultados da agitação magnética com rotação de 200 rpm (70,81 g.L⁻¹) e os valores obtidos com a agitação de 164 rpm utilizando incubadora rotatória (67,70 g.L⁻¹). A concentração de GOS foi maior para produção em agitação magnética, apresentando um aumento de 3,11 g.L⁻¹. Entretanto, é importante considerar a atividade do biocatalisador utilizado na produção dos GOS. Como foi apresentado com a agitação magnética o biocatalisador apresentou uma atividade enzimática 30,43% maior que o utilizado para produção na incubadora rotatória. Desse modo, avaliando os maiores valores para concentração de GOS, observa-se que o valor de 67,70 g.L⁻¹ foi aumentado em somente 5,28%, ou seja, com um acréscimo de 30,43% na atividade do biocatalisador imobilizado obteve-se uma concentração de GOS 5,28% maior. Assim, pode-se dizer que a produção foi melhor para o processo realizado em incubadora rotatória pois, mesmo com uma oferta enzimática menor obteve-se boas produções de GOS.

Contudo, a agitação magnética é uma boa alternativa em questões operacionais considerando que os agitadores magnéticos podem alcançar altas agitações. O uso de reator de mistura encamisado facilita a manutenção da temperatura. E outra vantagem é a utilização de

cesta de aço inox para abrigar o biocatalisador imobilizado, a cesta reduz o atrito do biocatalisador prevenindo possíveis inativações. Dessa forma, como obteve-se uma boa concentração de GOS (70,81 g.L⁻¹) pode-se definir a agitação magnética e a produção em reator de mistura como uma metodologia promissora para síntese dos GOS.

4.10.2 Agitação mecânica na síntese de galacto-oligosacarídeos

A síntese dos GOS também foi avaliada com agitação mecânica. Utilizou os reatores de mistura com agitadores do tipo hélice. Utilizando a concentração inicial de lactose a 400 g.L⁻¹, 40 °C no tempo de 8 horas. O agitador mecânico permitiu agitações ainda maiores, foram avaliadas 400 e 600 rpm, os resultados são apresentados na Tabela 4.14. A atividade enzimática do biocatalisador imobilizado utilizado para a condição de 400 rpm foi 416,67 U.g⁻¹ de sílica e a 600 rpm a atividade enzimática foi de 462,50 U.g⁻¹.

Tabela 4.14 - Concentração de GOS e rendimento de GOS na síntese por agitação mecânica a 400 e 600 rpm nas condições de concentração de lactose 400 g.L⁻¹ a 40 °C

Tempo	400 rpm (416,67 U.g ⁻¹)		600 rpm (462,50 U.g ⁻¹)	
	Concentração de GOS (g.L ⁻¹)	Rendimento de GOS (%)	Concentração de GOS (g.L ⁻¹)	Rendimento de GOS (%)
2	78,11	19,53	67,99	17,00
4	89,92	22,48	80,92	20,23
6	90,37	22,60	88,53	22,13
8	81,36	20,34	63,29	15,82

De acordo com os resultados da Tabela 4.14 observa-se que para 400 rpm a concentração de GOS variou de 78,11 a 90,37 g.L⁻¹ e o rendimento de 19,53 a 22,60%. Para a condição de 600 rpm a concentração de GOS variou de 67,99 a 88,53 g.L⁻¹ e o rendimento de 17,00 a 22,13%. Os melhores resultados para as duas condições foram obtidos no tempo de 6 horas, tanto para a concentração como para o rendimento. Comparando com a síntese em incubadora rotatória (item 4.9) e agitação magnética (4.10.1) observa-se que a produção foi mais rápida (6 h), sendo que para os outros os melhores resultados foram obtidos em 8 h. O que pode estar relacionado à forma e velocidade de agitação que foram maiores (400 e 600 rpm), enquanto nas outras produções foram de 164 e 200 rpm. Ao final das 8 horas de reação a conversão de lactose foi 76,53% para 400 rpm e 80,74% para 600 rpm.

A síntese de GOS atingiu bons resultados com concentração de GOS com cerca de 90 g.L⁻¹. Contudo, se faz necessário avaliar as atividades enzimáticas dos biocatalisadores. A diferença de atividade entre a condição de 400 rpm e 600 rpm foi de 45,83 U.g⁻¹, sendo a maior atividade para 600 rpm. Em relação a concentração de GOS na condição de 400 rpm o maior valor obtido foi de 90,37 g.L⁻¹, enquanto para 600 rpm esse valor foi 88,53 g.L⁻¹, ou seja, teve uma redução de 2,0%. Assim, observa-se que os resultados são próximos, pois com um aumento de 11,00% na atividade do biocatalisador a concentração de GOS se diferenciou em apenas 2,0%.

Os resultados obtidos podem ser comparados com os apresentados no estudo de Carevic et al. (2018), que utilizaram β -galactosidase de *L. acidophilus* imobilizada com polímero metacrílico Lifetech ECR8409 na síntese dos GOS. A produção de GOS foi de 86 g.L⁻¹ nas condições de concentração inicial de lactose de 400 g.L⁻¹, tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 6,8, 150 rpm à 50 °C. A concentração de GOS foi próxima a alcançada com a β -galactosidase de *K. marxianus* imobilizada em sílica que foi de 90,37 g.L⁻¹.

São um conjunto de variáveis que devem ser analisadas, a variação na atividade do biocatalisador imobilizado foi uma questão desafiadora em termos de padronização, por isso é necessário avaliar cuidadosamente cada experimento. Foi definido como uma condição de operação promissora a utilização de agitação mecânica a 400 rpm. Essa condição proporciona uma alta agitação, apresentou bons resultados (90,37 g.L⁻¹ de GOS) e nos tempos analisados manteve a integridade física da sílica utilizada como suporte.

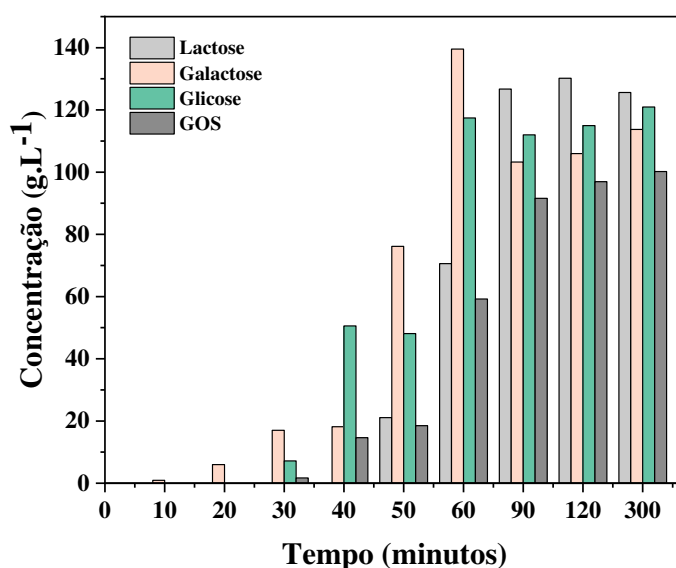
4.11 SÍNTESE DE GALACTO-OLIGOSSACARÍDEOS EM REATOR TIPO LEITO FIXO UTILIZANDO A β -GALACTOSIDASE COMERCIAL IMOBILIZADA EM SÍLICA

A síntese dos GOS foi também avaliada em reator tipo leito fixo, com intuito de maximizar a produção. Utilizou uma massa de biocatalisador imobilizado de 1,9 g, apresentando atividade enzimática de 13,33 U.g⁻¹ de suporte. O processo foi conduzido em regime contínuo, utilizando alimentação de solução de lactose a 400 g.L⁻¹ com vazão de 0,100 mL.min⁻¹ e tempo de residência no reator de 54,98 minutos. Os resultados das concentrações de lactose, galactose, glicose e GOS são apresentados na Figura 4.26.

Na Figura 4.26 observa-se que não foi identificado concentrações de lactose para os tempos de 10, 20, 30 e 40 minutos. Somente a partir do tempo de 50 minutos a concentração de lactose começa a subir, sendo crescente até os 120 minutos de reação. Essa situação não

corresponde a alimentação inicial de lactose a 400 g.L^{-1} , então entende-se que a solução de lactose não estava completamente solubilizada. A alimentação da solução de lactose foi feita a 40°C , sob constante agitação, entretanto não foi suficiente para garantir completa solubilização da lactose.

Figura 4.26 - Concentrações de lactose, galactose, glicose e GOS utilizando reator tipo leito fixo com alimentação de solução de lactose 400 g.L^{-1} , a 40°C , vazão de $0,1 \text{ mL.min}^{-1}$



Mesmo com o problema na alimentação, a produção de GOS e a hidrólise da lactose aconteceram. A concentração de GOS foi máxima em 300 minutos de reação, alcançando uma concentração de $100,18 \text{ g.L}^{-1}$ e um rendimento de 25,05%. Juntamente com a produção observa-se desde o tempo de 30 minutos a hidrólise da lactose, formando glicose e galactose. A reação foi interrompida em 300 minutos, contudo acredita que é necessário avaliar outras condições para conseguir maiores concentrações de GOS, considerando os efeitos mencionados da solução de alimentação e também em relação tempo de residência do reator. Pode ser observado também que a hidrólise da lactose foi bem competitiva com a transgalactosilação, produzindo altas concentrações de galactose ($113,71 \text{ g.L}^{-1}$) e glicose ($120,96 \text{ g.L}^{-1}$) em 300 minutos. Eskandarloo; Abbaspourrad (2018) avaliaram a formação de GOS em leito fixo com β -galactosidase imobilizada em esferas de vidro. Utilizando uma temperatura em 60°C , e vazão de $0,5 \text{ mL/min}$ alcançaram um rendimento de 25,2%, rendimento próxima ao obtido neste trabalho com a β -galactosidase imobilizada em sílica (25,05%).

Os resultados obtidos podem ser comparados com os alcançados por Sen et al. (2014). Eles avaliaram a produção de GOS com β -galactosidase de *B. circullans* microencapsulada em esferas de alginato de cálcio. A produção foi em reator tipo leito fixo. Com uma alimentação de solução de lactose a 200 kg.m^{-3} foi obtido uma produção de 40 kg.m^{-3} ou 40 g.L^{-1} . O valor é inferior ao obtido para β -galactosidase imobilizada em sílica que mesmo com problemas na alimentação alcançou uma concentração de GOS de $100,18 \text{ g.L}^{-1}$.

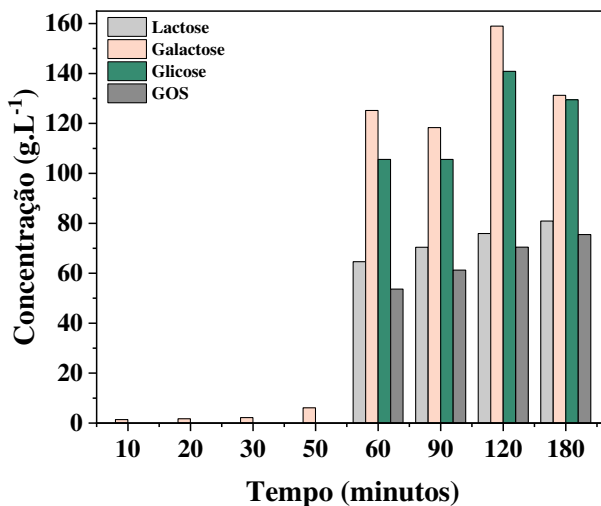
Esses resultados mostram o potencial de aplicação de reator tipo leito fixo, porém mais variáveis precisam ser analisadas e acertadas considerando a solubilidade da lactose, tempo de reação e temperatura.

4.11.1 Leito fixo empacotado com β -galactosidase comercial imobilizada em sílica associada com esferas de vidro na síntese dos galacto-oligossacarídeos

Na intenção de melhorar a síntese dos GOS em leito fixo, utilizou uma coluna com dimensões maiores, para aumentar o tempo de residência. Entretanto, utilizou a mesma quantidade de biocatalisador imobilizado (1,9 g). Para completar a coluna utilizou esferas de vidro como material inerte, a razão de M_B/M_I usada foi de $1/8 \text{ g.g}^{-1}$. Na Figura 4.27 são apresentadas as concentrações de lactose, galactose, glicose e GOS. O processo foi conduzido a 40°C , com alimentação de solução de lactose 400 g.L^{-1} , vazão de $0,1 \text{ mL.min}^{-1}$ e tempo de residência no reator de 217,60 minutos. A atividade enzimática do biocatalisador imobilizado era de $59,11 \text{ U.g}^{-1}$, comparando com a atividade do biocatalisador imobilizado no leito fixo empacotado somente com sílica que era de $13,33 \text{ U.g}^{-1}$, observa-se uma grande diferença ($45,78 \text{ U.g}^{-1}$).

Os resultados obtidos para concentração de lactose para o leito fixo com esferas de vidro, mostram o mesmo comportamento obtido no reator empacotado somente com sílica. Os valores de lactose foram crescentes do tempo de 60 a 180 minutos, sendo que de 10 a 50 minutos não foi observado a presença de lactose. Da mesma forma, entende-se que a solução de lactose alimentada não estava na concentração de 400 g.L^{-1} . O problema previsto é em relação a solubilidade da lactose, que deve ser melhor estudado e adequado ao processo. As concentrações de galactose e glicose também se destacam, mostrando que houve uma boa taxa de hidrólise da lactose. Os maiores valores foram alcançados no tempo de 120 minutos, sendo $158,98 \text{ g.L}^{-1}$ de galactose e $140,88 \text{ g.L}^{-1}$ de glicose.

Figura 4.27 - Concentrações de lactose, galactose, glicose e GOS utilizando reator tipo leito fixo com sílica e esferas de vidro. Alimentação de solução de lactose a 400 g.L^{-1} , a 40°C , vazão de $0,1 \text{ mL.min}^{-1}$



Apesar do problema na alimentação em relação a solubilidade da lactose alimentada, observou-se a síntese de GOS. A concentração máxima foi obtida em 180 minutos, sendo de $75,51 \text{ g.L}^{-1}$. Comparando esses resultados com os obtidos para o leito fixo empacotado apenas com sílica imobilizada, observa-se que os valores máximos de GOS foram menores. Na primeira configuração de reator a concentração de GOS foi de $100,18 \text{ g.L}^{-1}$ em 300 min e na segunda configuração a concentração de GOS foi de $75,51 \text{ g.L}^{-1}$ em 180 min.

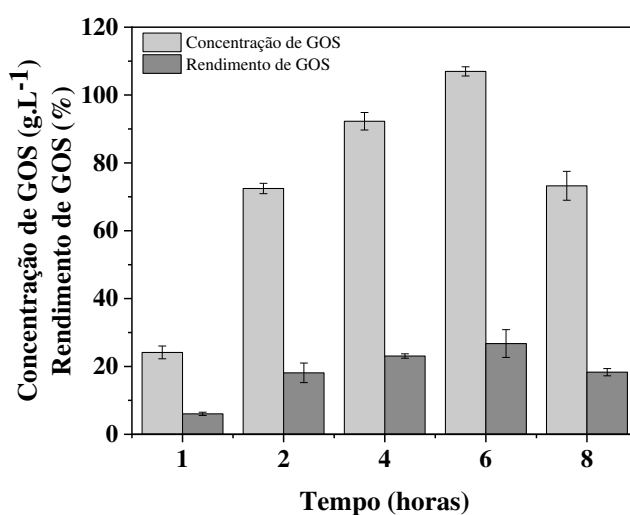
Com esses resultados pode-se dizer que a presença das esferas de vidro foi satisfatória, foi alcançado uma concentração de GOS de $75,51 \text{ g.L}^{-1}$. Todavia, é necessário aprofundar as condições das reações com intuito de aumentar ainda mais a produção. Uma primeira estratégia poderia ser utilizar tempos maiores e observar o comportamento também é necessário reavaliar a solubilidade da solução de lactose na alimentação do leito fixo. Essa configuração de reator apresenta uma metodologia com potencial de aplicação.

4.12 SÍNTESE DE GALACTO-OLIGOSSACARÍDEOS COM A β -GALACTOSIDASE PRODUZIDA POR *K. marxianus* NA SUA FORMA LIVRE E IMOBILIZADA EM SÍLICA

Depois de avaliar as condições de síntese dos GOS para a β -galactosidase comercial de *K. lactis*, reproduziu uma das melhores condições de operação com a β -galactosidase produzida por *K. marxianus* em sua forma livre (extrato bruto enzimático) e imobilizada. A produção foi

feita em reator de mistura com agitação mecânica a 400 rpm, concentração de lactose de 400 g.L⁻¹ a 40 °C. A atividade enzimática do extrato bruto obtido foi de 116,00 U. A Figura 4.28 mostra os resultados alcançados para concentração de GOS e rendimento de GOS.

Figura 4.28 - Concentração de GOS e rendimento de GOS na síntese por agitação magnética em reator de mistura com β -galactosidase livre produzida por *K. marxianus*. Nas condições de concentração de lactose 400 g.L⁻¹ a 40 °C e 400 rpm



Como pode ser observado na Figura 4.28 a produção de GOS foi crescente até o tempo de 6 horas. A concentração máxima de GOS obtida foi de 106,97 g.L⁻¹ e o rendimento de 26,74% em 6 horas. Ao final das 8 horas de reação a conversão de lactose foi de 75,96 ± 2,1%. Com esses resultados observa-se que a produção com a enzima produzida em sua forma livre foi eficiente. Comparando com os resultados obtidos com a produção nas mesmas condições da enzima comercial imobilizada no item (4.10.2), observa-se que síntese com a enzima produzida alcançou melhores resultados. Ofertando apenas 116,00 U foi alcançado 106,97 g.L⁻¹ de GOS, enquanto ofertando 416,67 U.g⁻¹ com a enzima comercial imobilizada obteve-se 90,37 g.L⁻¹. No entanto, é interessante avaliar as condições cautelosamente, considerando que foi comparado uma enzima em sua forma livre e outra imobilizada.

Botvynko et al. (2019) alcançaram concentrações de 105 g.L⁻¹ de GOS, utilizando duas enzimas comerciais sendo uma de *K. lactis* e a outra de *Bifidobacterium bifidum*. Comparando com os resultados obtidos com a β -galactosidase produzida por *K. marxianus* observa-se concentração de GOS parecida (106,97 g.L⁻¹), mesmo utilizando apenas uma fonte enzimática e sem um processo de purificação da enzima.

O extrato bruto enzimático foi preparado em tampão fosfato de potássio 0,05 M, pH 7,0, mas a enzima foi produzida em um meio com presença de permeado de soro de leite e sais ((NH₄)₂SO₄; KH₂PO₄; MgSO₄.7H₂O) esse meio enriquecido com tantas substâncias pode ter influenciado na capacidade de síntese de GOS da enzima produzida. Segundo Alavijeh et al. (2020) a presença de cátions como sódio (Na⁺), potássio (K⁺), cálcio (Ca⁺) e magnésio (Mg⁺) podem afetar a robustez da enzima e atuarem como cofatores, influenciando diretamente na ligação do substrato aos cátions no sítio ativo da enzima, o que pode ser benéfico ao processo. Rustom; Foda; López-Leiva (1988) trouxeram que o permeado de soro de leite é rico em K⁺ e Mg⁺ e esses cátions podem contribuir na ativação da enzima e assim no processo de síntese dos GOS.

Para a enzima imobilizada a atividade enzimática do biocatalisador imobilizado foi de 2,64 U ou 26,4 U.g⁻¹ de suporte. Essa atividade enzimática foi baixa considerando os resultados para a produção com a enzima comercial (>100 U.g⁻¹). Já havia sido discutido a dificuldade da imobilização em sílica do extrato bruto enzimático, mesmo assim utilizou o biocatalisador imobilizado para produção dos GOS. Contudo, não houve produção de GOS nas 8 horas de reação avaliadas. Também não foi observado a hidrólise da lactose. Assim, para a enzima produzida imobilizada outras condições devem ser avaliadas considerando suas baixas atividades enzimáticas.

CAPÍTULO 5

CONCLUSÕES

Com base nos objetivos propostos e diante dos resultados obtidos, pode-se concluir que:

- ✓ As condições que foram mais promissoras na imobilização da β -galactosidase (Lactozyme[®] 2600 L, *K. lactis*) em sílica de porosidade controlada foram obtidas em tempo de 6 h de imobilização com funcionalização da sílica por via aquosa. Através de um Planejamento Composto Central, que avaliou simultaneamente as variáveis concentração de APTES, atividade inicial da enzima ofertada e concentração de glutaraldeído, obteve-se a faixa otimizada em 1,0% de APTES, 21 U.mL⁻¹ de extrato enzimático para atividade inicial ofertada e 6,86% de glutaraldeído.
- ✓ A partir da caracterização da β -galactosidase imobilizada em sílica observou-se que na atividade da enzima o pH ótimo foi em 7,0 e a temperatura ótima de 35 °C. Na estabilidade o melhor pH foi em 7,5. A estabilidade térmica da enzima foi limitada, sendo mais estável a 20 °C, tendo sua atividade rapidamente reduzida em 40 e 45 °C. As constantes termodinâmicas avaliadas, sofreram poucas variações nas temperaturas estudadas. A β -galactosidase imobilizada permitiu reutilização mantendo 70% da sua atividade após 4 ciclos de reuso. A enzima também foi armazenada sob refrigeração e em 105 dias reteve 44% da sua atividade inicial.
- ✓ O biocatalisador imobilizado foi avaliado em relação a espectroscopia de infravermelho (FT-IR) e no MEV. Por meio do FT-IR foi possível observar os grupos presentes na enzima e no biocatalisador imobilizado. O MEV trouxe uma visualização da característica real da sílica e evidenciou a ligação da enzima na superfície do suporte.
- ✓ A utilização de reator de leito fixo em regime contínuo empacotado com β -galactosidase imobilizada levou a uma conversão de lactose de aproximadamente 47%, alcançando estado estacionário em 95 min.
- ✓ Para β -galactosidase de *K. marxianus* sintetizada por meio de fermentação submersa, observou-se que não foi possível obter as mesmas respostas no processo de imobilização. Pois, a atividade da enzima imobilizada e a atividade

recuperada foram bem inferiores ao que foi obtido pela Lactozyme® 2600 L que é uma enzima comercial e purificada.

- ✓ Na tentativa de aumentar as respostas de imobilização com β -galactosidase produzida por *K. marxianus*, foram avaliados alguns métodos de purificação, dentre eles: ligação Duolite A-568 em leito fixo, diálise, precipitação com sal e ligação em resina como Amberlite XAD-761®, Amberjet™ 4200 Cl e Toyopearl® DEAE 650s. Os mais promissores como estratégias de purificação foram o processo de diálise e a adsorção em Toyopearl® DEAE 650s.
- ✓ Para produção dos GOS com a β -galactosidase (Lactozyme® 2600 L, *K. lactis*) os melhores resultados foram obtidos em maiores concentrações iniciais de lactose, sendo necessários menores tempos de reação para enzima em sua forma livre (1 h) e maiores tempos para β -galactosidase imobilizada em sílica (6 h).
- ✓ A força iônica do tampão utilizada na reação de transgalactosilação afeta a produção de GOS, sendo obtido melhores resultados com força iônica do tampão fosfato de potássio em 0,05 M, concentração mais baixa.
- ✓ Os resultados do Planejamento Fatorial Fracionário mostraram que a concentração inicial de lactose, a agitação e a temperatura apresentaram efeitos positivos na concentração dos GOS em nível de significância de 10%. A agitação foi o efeito mais expressivo, seguido da ação conjunta da agitação e concentração de lactose, concentração de lactose, temperatura e ação conjunta da agitação e temperatura. A concentração máxima de GOS obtida foi de 67,70 g.L⁻¹.
- ✓ A síntese de GOS utilizando agitação magnética foi promissora alcançando uma concentração de 70,81 g.L⁻¹ e rendimento de 17,70%. A agitação foi em torno de 200 rpm.
- ✓ Em agitação mecânica as melhores produções de GOS com a β -galactosidase (Lactozyme® 2600 L, *K. lactis*) imobilizada em sílica foram obtidos com agitação de 400 rpm. O tempo de reação foi mais rápido quando comparado a agitação magnética e processo em incubadora rotatória, sendo os maiores valores alcançados em 6 horas. A concentração de GOS foi de 90,37 g.L⁻¹ e o rendimento de 22,60%.
- ✓ A avaliação do leito fixo como reator para síntese dos GOS, apresentou produção razoável. É necessário avaliar melhor as condições operacionais,

todavia obteve-se concentração de GOS de 100,18 g.L⁻¹ utilizando reator empacotado somente com sílica imobilizada e 75,51 g.L⁻¹ com o reator empacotado com sílica imobilizada e esferas de vidro.

- ✓ A síntese dos GOS também foi avaliada para a β -galactosidase produzida por *K. marxianus*, na sua forma livre e imobilizada. A produção com a enzima livre em agitação mecânica conduzida em reator de mistura, levou a concentração de GOS de 106,97 g.L⁻¹. Com a enzima imobilizada a atividade enzimática foi muito baixa (2,64 U), não houve produção de GOS, nem mesmo hidrólise da lactose.
- ✓ As condições estudadas mostraram o potencial de aplicação da β -galactosidase (Lactozyme[®] 2600 L, *K. lactis*) imobilizada em sílica de porosidade controlada na hidrólise da lactose e na síntese dos GOS. A β -galactosidase produzida por *K. marxianus* também é promissora sendo necessário considerar o estudo mais aprofundado de técnicas de purificação que colaborem no processo de imobilização e também na produção dos GOS.

CAPÍTULO 6

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- ✓ Avaliar outras condições da resina aniônica Toyopearl® DEAE 650s como uma estratégia de purificação da β -galactosidase produzida por *K. marxianus*.
- ✓ Utilizar o permeado de soro de leite como fonte de lactose na síntese dos GOS, com a intenção de valorizar esse subproduto.
- ✓ Estudar técnicas para identificação, purificação e separação dos GOS produzidos.
- ✓ Avaliar a união de duas enzimas de fontes diferentes, com intuito de melhorar os rendimentos na produção dos GOS.

CAPÍTULO 7

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABURTO, C.; GUERRERO, C.; VERA, C.; ILLANES, A. Improvement in the yield and selectivity of lactulose synthesis with *Bacillus circulans* β -galactosidase. **LWT - Food Science and Technology**, v. 118, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108746>

ADAMS, J. B. Review: Enzyme inactivation during heat processing of food-stuffs. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 26, p. 1-20, 1991. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1991.tb01136>

ALAVIJEH, M. K.; MEYER, A. S.; GRAS, S.; KENTISH, S. E. The role of cations in regulating reaction pathways driven by *Bacillus circulans* β -galactosidase. **Chemical Engineering Journal**, v. 395, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2020.125067>

ALBUQUERQUE, T. L., GOMES, S. D. L., D'ALMEIDA, A. P., FERNANDEZ-LAFUENTE, R., GONÇALVES, L. R. B., ROCHA, M. V. P. Immobilization of β -galactosidase in glutaraldehyde-chitosan and its application to the synthesis of lactulose using cheese whey as feedstock. **Process Biochemistry**, v. 73, p. 65-73, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.08.010>

ALBUQUERQUE, T. L., SOUSA, M., SILVA, N. C. G., GIRÃO NETO, C. A. C., GONÇALVES, L. R. B., FERNANDEZ-LAFUENTE, R., ROCHA, M. V. P. β -Galactosidase from *Kluyveromyces lactis*: Characterization, production, immobilization and applications - A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 191, p. 881-898, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.09.133>

ANSARI, A. S.; HUSAIN, Q. Immobilization of *Kluyveromyces lactis* β -galactosidase on concanavalin A layered aluminium oxide nanoparticles-Its future aspects in biosensor applications. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 70, p. 119-126, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2011.02.016>

ANSARI, S. A.; SATAR, R.; ALAM, F.; ALQAHTANI, M. H.; CHAUDHARY, A. G.; NASEER, M. I.; KARIM, S.; SHEIKH, I. A. Cost effective surface functionalization of silver nanoparticles for high yield immobilization of *Aspergillus oryzae* β -galactosidase and its application in lactose hydrolysis. **Process Biochemistry**, v. 47, p. 2427-2433, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2012.10.002>

ANSARI, S. A.; SATAR, R. Recombinant β -galactosidases – Past, present and future: A mini review. **Journal of Molecular Catalysis B, Enzymatic**, v. 81, p. 1-6, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2012.04.012>

ARGENTA, A. B.; NOGUEIRA, A.; SCHEER, A. P. Hydrolysis of whey lactose: *Kluyveromyces lactis* β -galactosidase immobilisation and integrated process hydrolysis-ultrafiltration. **International Dairy Journal**, v. 117, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2021.105007>

ARSALAN, A.; ALAM, M. F.; ZOFAIR, S. F. F., AHMAD, S.; YOUNUS, H. Immobilization of β -galactosidase on tannic acid stabilized silver nanoparticles: A safer way towards its industrial application. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 226, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2019.117637>

BAO, J., FURUMOTO, K., FUKUNAGA, K., NAKAO, K. A., KOUMATSU, K.; YOSHIMOTO, M. Deactivation kinetics of immobilized glucose oxidase for production of calcium gluconate in an external loop airlift bioreactor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 22, p. 33-41, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2004.08.001>

BARBOSA, O.; ORTIZ, C.; BERENGUER-MURCIA, A.; TORRES, R.; RODRIGUES, R. C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Strategies for the one-step immobilization-purification of enzymes as industrial biocatalysts. **Biotechnology Advances**, v.33, p. 435, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.03.006>

BASSO, A.; SERBAN, S. Industrial applications of immobilized enzymes - A review. **Molecular Catalysis**, v. 479, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.mcat.2019.110607>

BENIWAL, A.; SAINI, P.; KOKKILIGADDA, A.; VIJ, S. Use of silicon dioxide nanoparticles for β -galactosidase immobilization and modulated ethanol production by co-immobilized *K. marxianus* and *S. cerevisiae* in deproteinized cheese whey. **LWT - Food Science and Technology**, v. 87, p. 553-561, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.09.028>

BOSSO, A.; SETTI, A. C. I.; TOMAL, A. B.; GUEMRA, S.; MORIOKA, L. R. I.; SUGUIMOTO, H. H. Substrate consumption and beta-galactosidase production by *Saccharomyces fragilis* IZ 275 grown in cheese whey as a function of cell growth rate. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 21, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101335>

BOTVYNKO, A.; BEDNÁŘOVÁ, A.; HENKE, S.; SHAKHNO, N.; CURDA, L. Production of galactooligosaccharides using various combinations of the commercial β -galactosidases. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 517, p. 762-766, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.08.001>

BOURKAIB, M.C.; GAUDIN, P.; VIBERT, F.; GUIAVARC'H, Y.; DELAUNAY, S.; FRAMBOISIER, X.; HUMEAU, C.; CHEVALOT, I.; BLIN, J. APTES modified SBA15 and meso-macro silica materials for the immobilization of aminoacylases from *Streptomyces ambofaciens*. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 323, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2021.111226>

BRAGA, A. R. C.; SILVA, M. F.; OLIVEIRA, J. V.; TREICHEL, H.; KALIL, S. J. A new approach to evaluate immobilization of β -galactosidase on Eupergit® C: structural, kinetic, and thermal characterization. **Química Nova**, v. 37, p. 796-803, 2014. <https://doi.org/10.5935/0100-4042.20140128>

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 53. Enzimas e Preparações Enzimáticas para Uso na Produção de Alimentos Destinados ao Consumo Humano. **Diário Oficial da União**, Brasília, 07 out. 2014.

CAMPELLO, G. S.; TRINDADE, R. A.; RÊGO, T. V.; BURKERT, J. F. M.; BURKERT, C. A. V. Immobilization of β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* on Eupergit® C and Properties of the Biocatalyst. **International Journal of Food Engineering**, v. 8, p. 1-17, 2012. <https://doi.org/10.1515/1556-3758.2760>

CARDOSO, B. B.; SILVÉRIO, S. C.; ABRUNHOSA, L.; TEIXEIRA, J. A.; RODRIGUES, L. R. β -galactosidase from *Aspergillus laticoffeatus*: A promising biocatalyst for the synthesis of novel prebiotics. **International Journal of Food Microbiology**, v. 257, p. 67-74, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.06.013>

CAREVIC, M.; VUKAŠINOVIĆ-SEKULIĆ, M.; ČOROVIĆ, M.; ROGNIAUX, H.; ROPARTZ, D.; VELIČKOVIĆ, D.; BEZBRADICA, D. Evaluation of β -galactosidase from *Lactobacillus acidophilus* as biocatalyst for galacto-oligosaccharides synthesis: Product structural characterization and enzyme immobilization. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 126, p. 697-704, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2018.06.003>

CARGNIN, M. A.; GASPARIN, B. C.; PAULINO, A. T. Hydrolysis of lactose using β -D-galactosidase immobilized in pectin-based hydrogels: Modeling and optimization by factorial design. **LWT - Food Science and Technology**, v. 132, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109836>

CARVALHO, N. B.; LIMA, A. S.; SOARES, C. M. F. Uso de sílicas modificadas para imobilização de lipases. **Química Nova**, v. 38, n. 3, p. 399-409, 2015. <https://doi.org/10.5935/0100-4042.20140304>

CATANZARO, R.; SCIUTO, M.; MAROTTA, F. Lactose intolerance: An update on its pathogenesis, diagnosis, and treatment. **Nutrition Research**, v. 89, p. 23-34, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2021.02.003>

CHANALIA, P.; GANDHI, D.; ATTRI, P.; DHANDA, S. Purification and characterization of β -galactosidase from probiotic *Pediococcus acidilactici* and its use in milk lactose hydrolysis and galactooligosaccharide synthesis. **Bioorganic Chemistry**, v. 77 p. 176–189, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2018.01.006>

CHANDRAPALA, J.; WIJAYASINGHE, R.; VASILJEVIC, T. Lactose crystallization as affected by presence of lactic acid and calcium in model lactose systems. **Journal of Food Engineering**, v. 178, p. 181-189, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2016.01.019>

CHIBATA I. **Immobilized Enzymes-Research and Development**. Tokyo. KadanshaLtd. 1978.

DAIRY EXPORT COUNCIL, **Permeado de soro de leite e permeado de leite dos EUA**. USDEC-América do Sul, Brasil. Disponível em: www.thinkusadairy.org/Documents/Microsites/Portuguese/pt_2017%20Permeate.pdf. Acesso em: Novembro de 2016.

DALA-PAULA, B. M.; GOZZI, W. P.; KRINGEL, D. H.; PELOSO, E. F.; CÚSTODIO, F. B. **Química e bioquímica de alimentos**. 1 ed. Alfenas – MG: Editora Universidade de Alfenas, 2021. 250 f.

DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, G. M.; SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. **Química Nova**, v.27, n.4, p.623-630. 2004. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422004000400017>

ESKANDARLOO, H.; ABBASPOURRAD, A. Production of galacto-oligosaccharides from whey permeate using β -galactosidase immobilized on functionalized glass beads. **Food Chemistry**, v. 251, p. 115-124, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.01.068>

FAI, A. E. C.; PASTORE, G. M. Galactooligosacarídeos: produção, benefícios à saúde, aplicação em alimentos e perspectivas. **Scientia Agropecuaria**, v. 6, p. 69 – 81, 2015. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2015.01.07>

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 & Chemical Engineering Quarterly**, p.1-10, 2017. <https://doi.org/10.2298/CICEQ160912010F>

FALLEIROS, L. N. S. S. **Produção e caracterização de β -galactosidase *Kluyveromyces marxianus* ATCC 46537**. Tese de doutorado, Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, 150 p., 2016.

FISCHER, C., KLEINSCHMIDT, T. Synthesis of galactooligosaccharides by *Cryptococcus laurentii* and *Aspergillus oryzae* using different kinds of acid whey. **International Dairy Journal**, v. 112, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2020.104867>

FISCHER, J; GUIDINI, C. Z.; SANTANA, L. N. S.; RESENDE, M. M.; CARDOSO, V. L.; RIBEIRO, E. J. Optimization and modeling of lactose hydrolysis in a packed bed system using immobilized β -galactosidase from *Aspergillus oryzae*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 85-86, 178-186, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2012.09.008>

FOPASE, R.; PARAMASIVAM, S.; KALE, P.; PARAMASIVAM, B. Strategies, challenges and opportunities of enzyme immobilization on porous silicon for biosensing applications. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 8, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2020.104266>

GANJU, S.; GOGATE, P. R. A review on approaches for efficient recovery of whey proteins from dairy industry effluents. **Journal of Food Engineering**, v. 215, p. 84-96, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.07.021>

GAO, X.; WU, J.; WU, D. Rational design of the beta-galactosidase from *Aspergillus oryzae* to improve galactooligosaccharide production. **Food Chemistry**, v. 286, p. 362-367, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.01.212>

GARCIA-GALAN, C.; BERENGUER-MURCIA, A.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; RODRIGUES, R. C. Potential of Different Enzyme Immobilization Strategies to Improve Enzyme Performance. **Advanced Synthesis & Catalysis**, v. 353, n. 16, p. 2885-2904, Nov 2011. <https://doi.org/10.1002/adsc.201100534>

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

GIBSON, G. R.; HUTKINS, R.; SANDERS, M. E.; PRESCOTT, S. L.; REIMER, R. A.; SALMINEN, S. J.; SCOTT, K.; STANTON, C.; SWANSO, K. S.; CANI, P. D.; VERBEKE, K.; REID, G. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 14, p. 491-502, 2017. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2017.75>

GIORGI, S., RADDADI, N., FABBRI, A., TOSCHI, T.G., FAVA, F. Potential use of ricotta cheese whey for the production of lactobionic acid by *Pseudomonas taetrolens* strains. **New Biotechnology**, v. 42, p. 72-76, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2018.02.010>

GOLOWCZYK, M.; VERA, C.; SANTOS, M.; GUERRERO, C.; CARASI, P.; ILLANES, A. Use of whey permeate containing in situ synthesised galacto-oligosaccharides for the growth and preservation of *Lactobacillus plantarum*. **Journal of Dairy Research**, v. 80, p. 374-381, 2013. <https://doi.org/10.1017/S0022029913000356>

GONZALEZ-DELGADO, I.; LÓPEZ-MUÑOZ, M.; MORALES, G., SEGURA, Y. Optimisation of the synthesis of high galacto-oligosaccharides (GOS) from lactose with β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. **International Dairy Journal**, v. 61, p. 211-219, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2016.06.007>

GONZALEZ-DELGADO, I.; SEGURA, Y.; MARTÍN, A.; LÓPEZ-MUÑOZ, M.; MORALES, G. β -galactosidase covalent immobilization over large-pore mesoporous silica supports for the production of high galacto-oligosaccharides (GOS). **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 257, p. 51-61, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2017.08.020>

GOSLING, A.; STEVENS, G. W.; BARBER, A. R.; KENTISH, S. E.; GRAS, S. L. Recent advances refining galactooligosaccharide production from lactose. **Food Chemistry**, v. 121, p. 307-318, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.12.063>

GROSOVA, Z.; ROSENBERG, M.; REBROS, M. Perspectives and Applications of Immobilized β -galactosidase in Food Industry – a Review. **Czech Journal of Food Science**, Praha, vol. 26, n. 1, p. 1-14, 2008. <https://doi.org/10.17221/1134-CJFS>

GUERRERO, C., VALDIVIA, F., UBILLA, C., RAMÍREZ, N., GÓMEZ, M., ABURTO, C., VERA, C., ILLANES, A. Continuous enzymatic synthesis of lactulose in packed-bed reactor with immobilized *Aspergillus oryzae* β -galactosidase. **Bioresource Technology**, v. 278, p. 296-302, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.12.018>

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. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2011.04.010>

GÜNERKEN, W.; D'HONDT, E.; EPPINK, M.H.M.; GARCIA-CONZALEZ, L.; ELST, K.; WIJFFELS, R. H. Cell disruption for microalgae biorefineries. **Biotechnology Advances**, v. 33, 243-260, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.01.008>

GÜRDAZ, S.; GÜLEÇ, H. A.; MUTLU, M. Immobilization of *Aspergillus oryzae* β -galactosidase onto Duolite A568 Resin via Simple Adsorption Mechanism. **Food and Bioprocess Technology**, v. 5, p. 904–911, 2012. <https://doi.org/10.1007/s11947-010-0384-7>

HACKENHAAR, C. R.; SPOLIDORO, L. S.; FLORES, E. E. F.; KLEIN, M. P.; HERTZ, P. F. Batch synthesis of galactooligosaccharides from co-products of milk processing using immobilized β -galactosidase from *Bacillus circulans*. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 36, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2021.102136>

HAJJAR, R; OLIERO, M.; CUISINIERE, T.; FRAGOSO, G.; CALVÉ, A.; DJEDIAL, S.; ANNABI, B.; RICHARD, C. S.; SANTOS, M. M. Improvement of colonic healing and surgical recovery with perioperative supplementation of inulin and galacto-oligosaccharides. **Clinical Nutrition**, v. 40, p. 3842-3851, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2021.04.032>

HARRIS, E.L.L. **Protein purification methods: a practical approach**. 2 ed. Nova York: Oxford; 2001.

HEIDTMANN, R. B.; DUARTE, S. H.; PEREIRA, L. P.; BRAGA, A. R. C.; KALIL, S. J. Caracterização cinética e termodinâmica de β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 fracionada com sulfato de amônio. **Brasilian Journal of Food Technology**, v. 15, n. 1, p. 41-49, 2012. <https://doi.org/10.1590/S1981-67232012000100005>

HENLEY, J. P.; SADANA, A. Categorization of enzyme deactivations using a series type mechanism. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 7, p. 50-60, 1985. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(85\)90013-4](https://doi.org/10.1016/0141-0229(85)90013-4)

HOSEINIFAR, S. H.; HOSEINI, S. M.; BAGHERI, D. Effects of Galactooligosaccharide and *Pediococcus acidilactici* on Antioxidant Defence and Disease Resistance of Rainbow Trout, *Oncorhynchus Mykiss*. **Annals of Animal Science**, v. 17, p. 217-227, 2017. <https://doi.org/10.1515/aoas-2016-0024>

HOSSEINI, A.; MAS, J. The β -galactosidase assay in perspective: Critical thoughts for biosensor development. **Analytical Biochemistry**, v. 635, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2021.114446>

HU, K.; DICKSON, J.M. Membrane Processing for Dairy Ingredient Separation. **John Wiley and Sons Ltd.**, 2015. <https://doi.org/10.1002/9781118590331>

HUSAIN, Q. β -galactosidases and their potential applications: A review. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 30, n. 1, p.41-62, 2010. <https://doi.org/10.3109/07388550903330497>

HUSAIN, Q.; ANSARI, S. A.; ALAM, F., AZAM, A. Immobilization of *Aspergillus oryzae* β -galactosidase on zinc oxide nanoparticles via simple adsorption mechanism. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 49, p.37-43, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2011.03.011>

INTERNATIONAL SCIENTIFIC ASSOCIATION FOR PROBIOTICS AND PREBIOTICS (ISAPP). **Prebióticos**. Disponível em: <<https://isappscience.org/for-scientists/resources/prebiotics/>>. Acesso em: 30 de Agosto de 2021.

JAYAMUTHUNAGAI, J. SRISOWMEYA, G., CHAKRAVARTHY, M., GAUTAM, P. D-Tagatose production by permeabilized and immobilized *Lactobacillus plantarum* using whey permeate. **Bioresource Technology**, v. 235, p. 250-255, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.03.123>

Jl, D.; OEY, I.; AGYEI, D. Purification, characterization and thermal inactivation kinetics of β -galactosidase from *Lactobacillus leichmannii* 313. **LWT - Food Science and Technology**, v. 116, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108545>

JOCHEMS, P.; SATYAWALI, Y.; ROY, S. V.; DOYEN, W.; DIELS, L.; DEJONGHE, W. Characterization and optimization of β -galactosidase immobilization process on a mixed matrix membrane. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 49, p. 580 – 588, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2011.06.010>

KALATHINATHAN, P.; PULICHERLA, K.; SAIN, A.; GOMATHINAYAGAM, S.; JAYARAJ, R.; THANGARAJ, S.; MUTHUKALIANNAN, G. K. New alkali tolerant β -galactosidase from *Paracoccus marcusii* KGP – A promising biocatalyst for the synthesis of oligosaccharides derived from lactulose (OsLu), the new generation prebiotics. **Bioorganic Chemistry**, v. 115, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2021.105207>

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**, v. 5, p. 99-103, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2015.12.010>

KARIM, A.; GERLIANI, N.; AIDER, M. *Kluyveromyces marxianus*: An emerging yeast cell factory for applications in food and biotechnology. **International Journal of Food Microbiology**, v. 333, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108818>

KLEIN, M. P., FALLAVENA, L.P., SCHÖFFER, J.D.N., AYUB, M.A.Z., RODRIGUES, R.C., NINOW, J.L., HERTZ, P.F. High stability of immobilized β -d-galactosidase for lactose hydrolysis and galactooligosaccharides synthesis. **Carbohydrate Polymers**, v. 95, n 1, p. 465–470, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.02.044>

KLEIN, M. P.; HACKENHAAR, C. R.; LORENZONI, A. S. G.; RODRIGUES, R. C.; COSTA, T. M. H.; NINOW, J. L.; HERTZ, P. F. Chitosan crosslinked with genipin as support matrix for application in food process: Support characterization and β -d-galactosidase immobilization. **Carbohydrate Polymers**, v. 137, p. 184–190, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.10.069>

KUMURA, H.; ISHIDO, T.; SHIMAZAKI, K. Production and partial purification of proteases from *Aspergillus oryzae* grown in a medium based on whey protein as an exclusive nitrogen source. **Journal of Dairy Science**, v. 94, p. 657-667, 2011. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3587>

KURIBAYASHI, L. M.; RIBEIRO, V. P. R.; SANTANA, R. C.; RIBEIRO, E. J.; SANTOS, M. G.; FALLEIROS, L. N. S. S.; GUIDINI, C. Z. Immobilization of β -galactosidase from *Bacillus licheniformis* for application in the dairy industry. **Biotechnologically Relevant Enzymes and Proteins**, v. 105, p. 3601–3610, 2021. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11325-8>

LANE, M. M., MORRISEY, J. P. *Kluyveromyces marxianus*: a yeast emerging from its sister's shadow. **Fungal Biology Reviews**, v. 2, p. 1-10, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2010.01.001>

LEMES, A. C.; ÁLVARES, G. T.; KALIL, S. J. Extraction of β -galactosidase from *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 by ultrasonic method. **Biochemistry and Biotechnology Reports**, v. 1, n. 2, p. 7-13, 2012. <https://doi.org/10.5433/2316-5200.2012v1n2p7>

LI, W., WANG, K., SUN, Y., YE, H., HU, B., ZENG, X. Lactosucrose and its analogues derived from lactose and sucrose: Influence of structure on human intestinal microbiota in vitro. **Journal of Functional Foods**, v. 17, p. 73-89, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.05.015>

LIMA, A. F.; CAVALCANTE, K. F.; FREITAS, M. F. M.; RODRIGUES, T. H. S.; ROCHA, M. V. P.; GONÇALVES, L. R. B. Comparative biochemical characterization of soluble and chitosan immobilized β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* NRRL Y1564. **Process Biochemistry**, v. 48, p. 443–452, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2013.02.002>

LIMA, M. A.; FREITAS, M. F. M.; GONÇALVES, L. R. B.; SILVA JUNIOR, I. J. Recovery and purification of a *Kluyvermyces lactis* β -galactosidase by Mixed Mode Chromatography. **Journal of Chromatography B**, v. 1015-1016, p. 181-191, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.01.053>

LIMA, P. C.; GAZONI, I.; CARVALHO, M. G.; BRESOLIN, D.; CAVALHEIRO, D.; OLIVEIRA, D.; RIGO, E. β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* in genipin-activated chitosan: An investigation on immobilization, stability, and application in diluted UHT milk. **Food Chemistry**, v. 349, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129050>

LISBOA, C. R.; COSTA, F. A. A.; BURKERT, J. F. M.; BURKERT, C. A. V. Síntese de galacto-oligossacarídeos a partir de lactose usando β -galactosidase comercial de *Kluyveromyces lactis*. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 15, n. 1, p. 30-40, 2012. <https://doi.org/10.1590/S1981-67232012000100004>

LIU, D.; CHEN, J.; SHI, Y. Advances on methods and easy separated support materials for enzymes immobilization. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 102, p. 332-342, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.03.011>

LIU, H.; LIU, J.; TAN, B.; ZHOU, F.; QIN, Y.; YANG, R. Covalent immobilization of *Kluyveromyces fragilis* β -galactosidase on magnetic nanosized epoxy support for synthesis of galacto-oligosaccharide. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 35, p. 1287–1295, 2012. <https://doi.org/10.1007/s00449-012-0716-2>

LIU, P., ZHENG, Z., XU, Q., QIAN, Z., LIU, J. OUYANG, J. Valorization of dairy waste for enhanced D-lactic acid production at low cost. **Process Biochemistry**, v. 71, p. 18-22, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.05.014>

- LIU, Y.; CHEN, Z.; JIANG, Z.; YAN, Q.; YANG, S. Biochemical characterization of a novel β -galactosidase from *Paenibacillus barengoltzii* suitable for lactose hydrolysis and galactooligosaccharides synthesis. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 104, p. 1055-1063, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.06.073>
- LU, L.; GUO, L.; WANG, K.; LIU, Y.; XIAO, M. β -Galactosidases: A great tool for synthesizing galactose-containing carbohydrates. *Biotechnology Advances*, v. 39, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.107465>
- MAHONEY, R. R. Galactosyl-oligosaccharide formation during lactose hydrolysis: a review. *Food Chemistry*, v. 63, n° 2, p. 147-154, 1998. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(98\)00020-X](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(98)00020-X)
- MANERA, A. P.; COSTA, F. A. A.; RODRIGUES, M. I.; KALIL, S. J.; FILHO, F. M. Galactooligosaccharides Production Using Permeabilized Cells of *Kluyveromyces marxianus*. *International Journal of Food Engineering*, v. 6, 2010. <https://doi.org/10.2202/1556-3758.1917>
- MANO, M. C. R., PAULINO, B. N., PASTORE, G. M. Whey permeate as the raw material in galacto-oligosaccharide synthesis using commercial enzymes. *Food Research International*, v. 124, p. 78-85, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.09.019>
- MARTÍNEZ-VILLALUENGA, C.; CARDELLE-COBAS, A.; CORZO, N.; OLANO, A.; VILLAMIEL, M. Optimization of conditions for galactooligosaccharide synthesis during lactose hydrolysis by β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* (Lactozym 3000 L HP G). *Food Chemistry*, v. 107, p. 258-264, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.08.011>
- MARTINS, A. R.; BURKERT, C. A. V. Galacto-oligosacarídeos (GOS) e seus efeitos prebióticos e bifidogênicos. *Brazilian Journal of Food Technology*, v. 12, n. 3, p. 230-240, 2009. <https://doi.org/10.4260/BJFT2009800900017>
- MATEO, C.; PALOMO, J. M.; FERNANDEZ-LORETE, G.; GUIBAN, J. M.; FERNANDEZ-LORETE, R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 40, p. 1451-1463, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2007.01.018>
- 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. <https://doi.org/10.1590/S0104-42302010000200025>
- MILETIC, N.; NASTASOVIC, A.; LOOS, K. Immobilization of biocatalysts for enzymatic polymerizations: Possibilities. *Bioresource Technology*, v. 115, p. 126-135, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.11.054>
- MOHAMAD, N.R., MARZUKI, N.H.C., BUANG, N.A., HUYOP, F., WAHAB, R.A. An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes. *Biotechnology & Biotechnology Equipment*, v. 29, p. 205–220, 2015. <https://doi.org/10.1080/13102818.2015.1008192>

MOLLEA, C., MARMO, L., BOSCO, F. **Valorization of cheese whey; a by-product from the dairy industry**. 2013. <https://doi.org/10.5772/53159>

MORE, J. J.; WATSON, G. A. The Levenberg-Marquardt algorithm: implementation and theory. *Lecture Notes in Mathematics*. **Springer Verlag**, Berlin, v. 630, p. 105-116, 1977. <https://doi.org/10.1007/BFb0067700>

MORTAZ, E.; NOMANI, M.; ADCOCK, I.; FOLKERTS, G.; GARSSSEN, J. Galactooligosaccharides (GOS) and 2'-fucosyllactose (2'-FL) can directly suppress growth of specific pathogenic microbes and impact phagocytosis of neutrophils: Effects of GOS and 2-FL on bacterial growth and phagocytosis. *Nutrition*, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2022.111601>

MUKUNDAN, S.; MELO, J. S.; SEN, D.; BAHADUR, J. Enhancement in β -galactosidase activity of *Streptococcus lactis* cells by entrapping in microcapsules comprising of correlated silica nanoparticles. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 195, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2020.111245>

NARISSETTY, V. PARHI, P.; MOHAN, B.; HAZEENA, S. H.; KUMAR, A. N.; GULLÓN, B.; SRIVASTAVA, A.; NAIR, L. M.; ALPHY, M. P.; SINDHU, R.; KUMAR, V.; CASTRO, E.; AWASTHI, M. K.; BINOD, P. Valorization of renewable resources to functional oligosaccharides: Recent trends and future prospective. **Bioresource Technology**, v. 346, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126590>

NEDAEI, S.; NOORI, A.; VALIPOUR, A.; KHANIPOUR, A. A.; HOSEINIFAR, S. H. Effects of dietary galactooligosaccharide enriched commercial prebiotic on growth performance, innate immune response, stress resistance, intestinal microbiota and digestive enzyme activity in Narrow clawed crayfish (*Astacus leptodactylus* Eschscholtz, 1823). **Aquaculture**, v. 499, p. 80-89, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.08.076>

NISHA, S., ARUM, K.S., GOBI, N. A review on methods, application and properties of immobilized enzyme. **Chemical Science Review and Letters**, v. 1, p. 148–155, 2012.

NGUYEN, V.D.; STYEVKÓ, G.; TA, L.P.; TRAN, A. T. M.; BUJNA, E.; ORBÁN, P.; DAM, M.S.; NGUYEN, Q. D. Immobilization and some properties of commercial enzyme preparation for production of lactulose-based oligosaccharides. **Food and Bioproducts Processing**, v. 107, p. 97-103, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2017.11.004>

NGUYEN, V.D.; STYEVKÓ, G.; MADARAS, E.; HAKTANIRLAR, G.; TRAN, A. T. M.; BUJNA, E.; DAM, M. S.; QUANG D. NGUYEN, Q. D. Immobilization of β -galactosidase on chitosan-coated magnetic nanoparticles and its application for synthesis of lactulose-based galactooligosaccharides. **Process Biochemistry**, v. 84, p. 30-38, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.05.021>

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

OH, Y., EOM, G. T. Identification of a lactose-oxidizing enzyme in *Escherichia coli* and improvement of lactobionic acid production by recombinant expression of a quinoprotein glucose dehydrogenase from *Pseudomonas taetrolens*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 148, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2021.109828>

OH, Y., JANG, Y., HONG, S. H., HAN, J. J., EOM, G. T., Efficient production of lactobionic acid using genetically engineered *Pseudomonas taetrolens* as a whole-cell biocatalyst. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 141, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2020.109668>

PADILLA, B., FRAU, F., RUIZ-MATUTE, A.I., MONTILLA, A., BELLOCH, C., MANZANARES, P., CORZO, N. Production of lactulose oligosaccharides by isomerisation of transgalactosylated cheese whey permeate obtained by β -galactosidases from dairy *Kluyveromyces*. **Journal of Dairy Research**, v. 82, p. 356-364, 2015. <https://doi.org/10.1017/S0022029915000217>

PANESAR, P. S.; KAUR, R.; SINGH, R. S.; KENNEDY, J. F. Biocatalytic Strategies in the Production of Galacto-oligosaccharides and its Global Status. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 111, p. 667-679, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.01.062>

PANESAR, P. S.; KUMARI, S.; PANESAR, R. Potential Applications of Immobilized β -Galactosidase in Food Processing Industries. **Enzyme Research**, v. 2010, 16 p., 2010. <https://doi.org/10.4061/2010/473137>

PASSOS, F.R., MAESTRE, K.L., SILVA, B.F., RODRIGUES, A. C., TRIQUES, C.C., GARCIA, H.A., FAGUNDES-KLEN, M.R., SILVA, E.A., FIORESE, M.L. Production of a synbiotic composed of galacto-oligosaccharides and *Saccharomyces boulardii* using enzymatic-fermentative method. **Food Chemistry**, v. 353, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129486>

PAVIA, D.; LAMPMAN, G.; KRIZ, G.; VYVYAN, J. Introdução à espectroscopia. Cengage Learning, 2ª edição, 733 p., 2015.

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. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2011.11.031>

PORTNOY, M., BARBANO, D.M. Lactose: Use, measurement, and expression of results. **Journal of Dairy Science**, v. 104, p. 8314-8325, 2021. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-18706>

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

PRAZERES, A.R.; CARVALHO, F.; RIVAS, J. Cheese whey management: A review. **Journal of Environmental Management**, v. 110, 48-68, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2012.05.018>

QIAO, B.; WANG, T.; GAO, H.; JIN, Y. High density silanization of nano-silica particles using γ -aminopropyltriethoxysilane (APTES). **Applied Surface Science**, v. 351, p. 646-654, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2015.05.174>

RAMÍREZ, N., UBILLA, C., CAMPOS, J., VALENCIA, F., ABURTO, C., VERA, C., ILLANES, A., GUERRERO, C. Enzymatic production of lactulose by fed-batch and repeated fed-batch reactor. **Bioresource Technology**, v. 341, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125769>

RIBEIRO, E.J. **Estudo cinético da hidrólise de sacarose por invertase livre e imobilizada**. Tese de Doutorado – Universidade Estadual de Campinas. 234 p. 1989.

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**, 2018. <https://doi.org/10.1007/s10934-018-0615-2>

RICARDI, N. C.; MENEZES, E. W.; BENVENUTTI, E. V.; SCHÖFFER, J. N.; HACKENHAAR, C. R.; HERTZ, P. F.; COSTA, T. M. H. Highly stable novel silica/chitosan support for β -galactosidase immobilization for application in dairy technology. **Food Chemistry**, v.246, p. 343-350, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.11.026>

RICARDI, N. C.; ARENAS, L. T.; BENVENUTTI, E. V.; HINRICHS, R.; FLORES, E. E. E; HERTZ, P. F.; COSTA, T. M. H. High performance biocatalyst based on β -d-galactosidase immobilized on mesoporous silica/titania/chitosan material. **Food Chemistry**, v. 359, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129890>

RICO-RODRÍGUEZ, F.; VILLAMIEL, M.; RUIZ-ACEITUNO, L.; SERRATO, J. C.; MONTILLA, A. Effect of the lactose source on the ultrasound-assisted enzymatic production of galactooligosaccharides and gluconic acid. **Ultrasonic Sonochemistry**, v. 67, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2019.104945>

RIGO, D.; GAYESHI, L.; TRES, G. A.; CAMERA, F. D.; ZENI, J. VALDULGA, E.; CANSIAN, R. L.; BACKES, G. T. Produção Microbiológica de Enzimas: uma Revisão. **Brazilian Journal of Development**, v.7, n.1, p. 9232-9254, 2021. <https://doi.org/10.34117/bjdv7n1-624>

ROSA, M. C; CARMO, M. R. S.; BALTHAZAR, C. F.; GUIMARÃES, J. T.; ESMERINO, E. A.; FREITAS, M. Q.; SILVA, M. C.; PIMENTEL, T. C.; CRUZ, A. G. Dairy products with prebiotics: An overview of the health benefits, technological and sensory properties. *International Dairy Journal*, v. 117, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2021.105009>

RUSTOM, I. Y. S.; FODA, M. I.; LÓPEZ-LEIVA, M. H. Formation of oligosaccharides from whey UF-permeate by enzymatic hydrolysis – analysis of factors. **Food Chemistry**, v. 62, n. 2, p. 141- 147, 1998. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(97\)00203-3](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(97)00203-3)

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, v. 24, p. 567-572, 2004. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612004000400015>

SAQIB, S.; AKRAM, A.; HALIM, S. A.; TASSADUQ, R. Sources of β -galactosidase and its applications in food industry. **3 Biotech**, v. 7, 2017. <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0645-5>

SEN, P.; NATH, A.; BHATTACHARJEE, C.; CHOWDHURY, R.; BHATTACHARYA, P. Process engineering studies of free and micro-encapsulated β -galactosidase in batch and packed bed bioreactors for production of galactooligosaccharides. **Biochemical Engineering Journal**, v. 90, p. 59-72, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2014.05.006>

SHAFI, A.; AHMED, F.; HUSAIN, Q. β -Galactosidase mediated synthesized nanosupport for the immobilization of same enzyme: Its stability and application in the hydrolysis of lactose. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 184, p. 57-67, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.06.034>

SHAH, P.; SRIDEVI, N.; PRABHUNE, A.; RAMASWAMY, V. Structural features of *Penicillin acylase* adsorption on APTES functionalized SBA-15. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 116, p. 157-165, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2008.03.030>

SHELDON, R. A. Enzyme Immobilization: The Quest for Optimum Performance. **Advanced Synthesis & Catalysis** v. 349, p. 1289-1307, 2007. <https://doi.org/10.1002/adsc.200700082>

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

SHUKLA, T. P.; WIERZBICKI, L. E. Beta-galactosidase technology: a solution to the lactose problem. **Critical Reviews Food Technology**, v. 5, p. 325-356, 1975. 75. <https://doi.org/10.1080/10408397509527178>

SILVA, R. A. **Caracterização físico-química e purificação da bromelina do Ananas comosus (L) Merrill (Abacaxi-Bromeliaceae)**. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas. 83 p. 2008.

SIRISHA, V.L.; JAIN, A.; JAIN, A. Enzyme Immobilization: An Overview on Methods, Support Material, and Applications of Immobilized Enzymes. **Advances in Food and Nutrition Research**, p. 1-33, 2016. <https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2016.07.004>

SNOCH, W.; TATARUCH, M.; ZASTAWNY, O.; CICHÓN, E.; GOSSELIN, M.; CABANA, H.; GUZIKA, M. Hollow silica microspheres as robust immobilization carriers. **Bioorganic Chemistry**, v. 93, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.02.038>

SOUSA, C.C., GONÇALVES, G.T.I., FALLEIROS, L.N.S.S. Ethanol Production Using Agroindustrial Residues as Fermentation Substrates by *Kluyveromyces marxianus*. **Industrial Biotechnology**, v. 14, n. 6, p. 308-314, 2018. <https://doi.org/10.1089/ind.2018.0023>

SOUSA, C.C., RESENDE, M.M., FALLEIROS, L.N.S.S., RIBEIRO, E.J. Synthesis and Immobilization of β -galactosidase from *Kluyveromyces marxianus* Using Ion Exchange Resin. **Industrial Biotechnology**, v. 17, n. 1, p. 27-37, 2021. <https://doi.org/10.1089/ind.2020.0007>

SOUZA, C. J. F.; GARCIA-ROJAS, E. E.; SOUZA, C. S. F.; VRIESMANN, L. C.; VICENTE, J.; CARVALHO, M. G.; PETKOWICZ, C. L. O.; FAVARO-TRINDADE, C. S. Immobilization of β -galactosidase by complexation: Effect of interaction on the properties of

the enzyme. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 122, p. 594-602, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.11.007>

SUN, H., YOU, S., WANG, M., QI, W., SU, R., HE, Z. Recyclable strategy for the production of high-purity galacto-oligosaccharides by *Kluyveromyces lactis*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 64, n. 28, p. 5679–5685, 2016. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b01531>

SUWAL, S., BENTAHAR, J., MARCINIAK, A., BEAULIEUC, L., DESCHÊNES, J., DOYEN, A. Evidence of the production of galactooligosaccharide from whey permeate by the microalgae *Tetradesmus obliquus*. **Algal Research**, v. 39, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101470>

TIZCHANG, S.; KHIABANI, M. S.; MOKARRAM, R. R.; HAMISHEHKAR, H. Bacterial cellulose nano crystal as hydrocolloid matrix in immobilized β -galactosidase onto silicon dioxide nanoparticles. **LWT - Food Science and Technology**, v. 123, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109091>

TOMAL, A. A. B.; CUNHA, M. E. T.; BOSSO, A.; YOUSSEF, E. Y.; SUGUIMOTO, H. H. Avanços Tecnológicos na Obtenção, Purificação e Identificação de Galactooligossacarídeos e Estudo de suas Propriedades Prebióticas. **UNOPAR Científica Ciências Biológicas e Saúde**, v. 12, n. 4, p. 41-49, 2010.

TORRES, D.P.M.; GONÇALVES, M.P.F.; TEIXEIRA, J.A.; RODRIGUES, L.R. Galacto-oligosaccharides: production, properties, applications, and significance as prebiotics. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 9, p. 438-454. 2010. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2010.00119.x>

TSERMOULA, P.; KHAKIMOV, B.; NIELSEN, J. H.; ENGELSEN, S. B. WHEY - The waste-stream that became more valuable than the food product. **Trends in Food Science & Technology**, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.08.025>

TURNER, T.L., KIM, E., HWANG, C., ZHANG, G., LIU, J., JIN, Y. Short communication: Conversion of lactose and whey into lactic acid by engineered yeast. **Journal of Dairy Science**, v. 100, p. 124-128, 2017. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11784>

URRUTIA, P.; BERNAL, C.; WILSON, L.; ILLANES, A. Use of chitosan heterofunctionality for enzyme immobilization: β -galactosidase immobilization for galacto-oligosaccharide synthesis. **International Journal Biological Macromolecules**, v. 116, p. 182-193, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.04.112>

URRUTIA, P.; MATEO, C.; GUISAN, J. M.; WILSON, L.; ILLANES, A. Immobilization of *Bacillus circulans* β -galactosidase and its application in the synthesis of galacto-oligosaccharides under repeated-batch operation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 77, p. 41-48, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2013.04.015>

USTOK, F.I., TARI, C., HARSA, S., Biochemical and thermal properties of β -galactosidase enzymes produced by artisanal yoghurt cultures. **Food Chemistry**, v. 119, p. 1114–1120, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.08.022>

VÉNICA, C. I.; WOLF, V. I.; BERGAMINI, C. V.; PEROTTI, M. C. Effect of the incorporation of β -galactosidase in the GOS production during manufacture of soft cheese. **Food Research International**, v. 137, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109654>

VERA C, GUERRERO C, ABURTO C, CORDOVA A, ILLANES A. Conventional and non-conventional applications of β -galactosidases. **Biochim Biophys Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**, v. 1868, p. 1-12, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2019.140271>

VERA, C.; GUERRERO, C.; CONEJEROS, R.; ILLANES, A. Synthesis of galactooligosaccharides by β -galactosidase from *Aspergillus oryzae* using partially dissolved and supersaturated solution of lactose. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 50, 188-194, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2011.12.003>

VERMA, M.L.; BARROW, C.L.; KENNEDY, J.F.; PURI, M. Immobilization of β -d-galactosidase from *Kluyveromyces lactis* on functionalized silicon dioxide nanoparticles: Characterization and lactose hydrolysis. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 50, p. 432-437, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2011.12.029>

VIDYA, B.; PALANISWAMY, M.; ANGAYARKANNI, J.; AYU NAWAZ, K.; THANDEESWARAN, M.; KRISHNA CHAITHANY, K.; TEKLUU, B.; MUTHUSAMY, K.; GOPALAKRISHNAN, V. K. Purification and characterization of β -galactosidase from newly isolated *Aspergillus terreus* (KUBCF1306) and evaluating its efficacy on breast cancer cell line (MCF-7). **Bioorganic Chemistry**, v. 94, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.103442>

VIEIRA, D. C.; LIMA, L. N.; MENDES, A. A.; ADRIANO, W. S.; GIORDANO, R. C.; GIORDANO, R. L. C.; TARDIOLI, P. W. Hydrolysis of lactose in whole milk catalyzed by β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis* immobilized on chitosan-based matrix. **Biochemical Engineering Journal**, v. 81, p. 54-64, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2013.10.007>

WAHAB, R. A.; ELIAS, N.; ABDULLAH, F.; GHOSHAL, S. K. On the taught new tricks of enzymes immobilization: An all-inclusive overview. **Reactive and Functional Polymers**, v. 152, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2020.104613>

WANG, D.I.C. **Fermentation and Enzyme Technology**. New York: Wiley, 1976.

WANG, G., WANG, H., CHEN, Y., PEI, X., SUN, W., LIU, L., WANG, F., YAQWOOB, M. U., TAO, W., XIAO, Z., JIN, Y., YANG, S., LIN, D., WANG, M. Optimization and comparison of the production of galactooligosaccharides using free or immobilized *Aspergillus oryzae* β -galactosidase, followed by purification using silica gel. **Food Chemistry**, v. 362, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130195>

WANG, G.; ZHU, J.; LIU, L.; YAQWOOB, M. U.; PEIA, X.; TAO, W.; XIAO, Z.; SUN, W.; WANG, M. Optimization for galactooligosaccharides synthesis: A potential alternative for gut health and immunity. **Life Sciences**, v. 245, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.117353>

WEETALL, H. H. Covalent Coupling Methods for Inorganic Support Materials. **Methods in Enzymology**, v. 44, p. 134-148, 1976. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(76\)44012-0](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(76)44012-0)

WILMS, E.; AN, R.; SMOLINSKA, A.; STEVENS, Y.; WESELER, A. R.; ELIZALDE, M.; DRITTIJ, M.; IOANNOU, A.; SCHOOTEN, F. J.; SMIDT, H.; MASCLÉE, A. A. M.; ZOETENDAL, E. G.; JONKERSA, D. M. A. E. Galacto-oligosaccharides supplementation in prefrail older and healthy adults increased faecal bifidobacteria, but did not impact immune function and oxidative stress. **Clinical Nutrition**, v. 40, p. 3019-3031, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2020.12.034>

WOLF, M.; TAMBOURGI, E. B.; PAULINO, A. T. Stability of β -D-galactosidase immobilized in polysaccharide-based hydrogels. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 609, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2020.125679>

YAÑEZ-ÑECO, C.V., CERVANTES, F.V., AMAYA-DELGADO, L., BALLESTEROS, A.O., PLOU, F.J., ARRIZON, J. Synthesis of $\beta(1 \rightarrow 3)$ and $\beta(1 \rightarrow 6)$ galactooligosaccharides from lactose and whey using a recombinant β -galactosidase from *Pantoea anthophila*. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 49, p. 14-21, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2020.10.004>

YIN, H; BULTEMA, J. B.; DIJKHUIZEN, L.; LEEUWEN, S. S. V. Reaction kinetics and galactooligosaccharide product profiles of the β -galactosidases from *Bacillus circulans*, *Kluyveromyces lactis* and *Aspergillus oryzae*. **Food Chemistry**, v. 225, p. 230-238, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.01.030>

YIN, H. DIJKHUIZEN, L. LEEUWEN, S. S. Synthesis of galacto-oligosaccharides derived from lactulose by wild-type and mutant β -galactosidase enzymes from *Bacillus circulans* ATCC 31382. **Carbohydrate Research**, v. 465, p. 58-65, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2018.06.009>

YOU, S., CHANG, H., YIN, Q., QI, W., WANG, M., SU, R., HE, Z. Utilization of whey powder as substrate for low-cost preparation of β -galactosidase as main product, and ethanol as by-product, by a litre-scale integrated process. **Bioresource Technology**, v. 245, p. 1271-1276, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.08.092>

YOUSEFI, S.; HOSEINIFAR, S. H.; PAKNEJAD, H.; HAJIMORADLOO, A. The effects of dietary supplement of galactooligosaccharide on innate immunity, immune related genes expression and growth performance in zebrafish (*Danio rerio*). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 73, p. 192-196, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.12.022>

ZERVA, A., LIMNAIOS, A., KRITIKOU, A.S., THOMAIDIS, N.S., TAOUKIS, P., TOPAKAS, E. A novel thermophile β -galactosidase from *Thermothielavioides terrestris* producing galactooligosaccharides from acid whey. **New Biotechnology**, v. 63, p. 45-53, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2021.03.002>

ZHANG, D.; HEGAB, H. E.; LVOV, Y.; SNOW, L. D.; PALMER, J. Immobilization of cellulase on a silica gel substrate modified using a 3-APTES self-assembled monolayer. **Springer Plus**, 2016. <https://doi.org/10.1186/s40064-016-1682-y>

ZHOU, H. X., XU, J. L., CHI, Z., LIU, G. L., CHI, Z. M. β -Galactosidase over-production by a mig1 mutant of *Kluyveromyces marxianus* KM for efficient hydrolysis of lactose. **Biochemical Engineering Journal**, v. 76, p. 17-24, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2013.04.010>

ZHU, X., WANG, M., HUA, X., YAO, C., YANG, R. An innovative and sustainable adsorption-assisted isomerization strategy for the production and simultaneous purification of high-purity lactulose from lactose isomerization. **Chemical Engineering Journal**, v. 406, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2020.126751>

ANEXO

ANEXO A



Coleção de Culturas Tropical
www.cct.org.br

Fundação André Tosello
www.fat.org.br
R. Latino Coelho, 1301 - Pq. Tequero
CEP 13067-020 - Campinas, SP
Fone/Fax: (19) 3242-7022
Fax: (19) 3242-7827
CNPJ 46.126.322/0001-62

CERTIFICADO

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

CCT	Microrganismo	Referência	Lote
4086	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	ATCC 46537	T051/H

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

Microrganismo de 1ª passagem

Referência CCT: OS 130208

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


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

Campinas, 06 de Maio de 2013.

ANEXO B



SOORO

A dádiva do soro de leite.



Especificação Técnica

Permeado de Soro de Leite em Pó

ET034
Revisão: 05

Produto

Produto obtido da filtração por membranas de ultrafiltração retirando a proteína de soro, concentrando em evaporador a vácuo e seco através do processo tipo spray dryer.

Aplicações

O permeado de soro de soro de leite em pó pode ser utilizado nas aplicações de biscoitos, pães, chocolates, queijos processados entre outros.

Ingredientes

Permeado de Soro de Leite Resfriado.

Não contém Glúten

Embalagem

Sacos de papel multfolhados com saco de polietileno interno, contendo 25 kg. Pallet PBR 1100kg.

Características Sensoriais

Pó uniforme sem grumos.
Sabor e odor lácteos.
Cor branco a amarelado.

Condições de Armazenamento e Transporte

Armazenamento à temperatura ambiente, ao abrigo da luz e calor, em local fresco e arejado. Transportar protegido contra umidade e calor, não devendo ser transportado com outros materiais que possam de alguma forma contaminar o produto.

Parâmetros Físico Químicos

	Mínimo	Máximo
Umidade (%)	-	3
Acidez (% ácido láctico) ¹	-	2
pH	6,0	6,7
Cinzas (% sais minerais)	-	6
Lactose (%)	88	-
Proteína (%)	1,5	-

¹- Método C - IN 68/2006 MAPA

Informações Nutricionais

Porção de 100g	
Valor Calórico	370 kcal
Carboidratos	90 g
Proteínas	2,0 g
Gorduras Totais	<0,05g
Gorduras Saturadas	<0,05g
Gorduras Trans	<0,05g
Fibras Alimentares	<0,10g
Sódio	674 mg
Cálcio	530 mg

Parâmetros Microbiológicos

	Máximo
Aeróbios Mesófilos (UFC/g)	5x10 ⁴
Coliformes Totais (UFC/g)	1x10 ²
Coliformes Fecais (UFC/g)	1x10 ¹
Staphylococcus aureus (UFC/g)	1x10 ²
Salmonella (25g)	Ausente*
Bacillus cereus (UFC/g)	Máx 1 x 10 ³

* Análise semestral

Validade

Armazenado nas condições recomendadas, 12 meses a partir da data de fabricação.

Monitoramento

O monitoramento de contaminantes (Antibióticos, Pesticidas, Metais pesados, Micotoxinas, Microrganismos Patogênicos e Materiais Estranhos) é realizado de acordo com o Plano de Amostragem Interno e Legislações Vigentes.

Registro no Ministério da Agricultura nº 011/1328

ACEITE DO CLIENTE

Empresa:	<i>União das Indústrias de Laticínios do Paraná</i>	Data:	<i>24/03/15</i>
Nome:	<i>Robson de Oliveira</i>	Visto:	<i>[Assinatura]</i>
Função:	<i>Sócio Proprietário</i>		

Fone +55 (45) 3284-5300

www.sooro.com.br

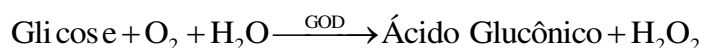
Sooro Concentrado Indústria de Produtos Lácteos Ltda
Caixa Postal 1066 - CEP 85960-000 - Rodovia BR 163 km 277 - Marechal Cândido Rondon - Paraná

APÊNDICE

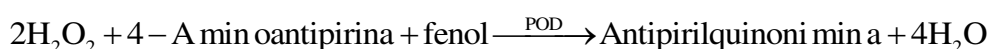
APÊNDICE A

DETERMINAÇÃO DE GLICOSE

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



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



O kit Glicose Liquiform contém 1000 mL de Reagente 1 e 5 mL de Padrão. O Reagente 1 é apresentado pronto para uso utilizando metodologia enzimática de grande especificidade analítica, de simples e fácil aplicação em laboratório.

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

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

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

Misturar vigorosamente e incubar em banho-maria a 37 +/- 2°C durante 10 minutos. Após esse tempo, as amostras eram lidas as absorvâncias a 505 nm em espectrofotômetro, considerando como branco o Reagente 1. Com os valores de absorvância em função da absorvância da amostra padrão (Equação) obtêm-se a concentração de glicose.

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

Assim foi possível determinar a concentração de glicose usando o kit Labtest.