



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Faculdade de Engenharia Química

Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos



**ESTUDO DA ESTABILIDADE DA BETA-GALACTOSIDASE IMOBILIZADA
DE *Bacillus licheniformis* E APLICAÇÃO EM REATOR DE LEITO FIXO**

Aliou Toro Lafia

Patos de Minas - MG

Fevereiro 2023



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Faculdade de Engenharia Química
Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos



Estudo da estabilidade da Beta-galactosidase imobilizada de *Bacillus Licheniformis* e aplicação em reator de leito fixo

Aliou Toro Lafia

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

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Larissa Nayhara
Soares Santana Falleiros

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

Patos de Minas - MG

Fevereiro 2023

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

L163 2023	Lafia, Aliou Toro, 1995- Estudo da estabilidade da beta-galactosidase imobilizada de bacillus licheniformis e aplicação em reator de leito fixo [recurso eletrônico] / Aliou Toro Lafia. - 2023. Orientadora: Carla Zanella Guidini. Coorientadora: Larissa Nayhara Soares Santana Falleiros. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-graduação em Engenharia de Alimentos. Modo de acesso: Internet. Disponível em: http://doi.org/10.14393/ufu.di.2023.79 Inclui bibliografia. Inclui ilustrações. 1. Alimentos - Indústria. I. Guidini, Carla Zanella , 1983-, (Orient.). II. Falleiros, Larissa Nayhara Soares Santana, 1988-, (Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Engenharia de Alimentos. IV. Título. CDU: 664
--------------	---

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:
Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Engenharia de Alimentos				
Defesa de:	Dissertação de Mestrado Acadêmico n. 2/2023 - PPGEA				
Data:	Nove de fevereiro de dois mil e vinte e três	Hora de início:	14:00	Hora de encerramento:	17:15
Matrícula do Discente:	42112EAL010				
Nome do Discente:	Allou Toro Lafia				
Título do Trabalho:	Estudo da estabilidade da beta-galactosidase imobilizada de <i>Bacillus licheniformis</i> e aplicação em reator de leito fixo				
Área de concentração:	Engenharia de Alimentos				
Linha de pesquisa:	Processos Biotecnológicos				

Reúne-se por webconferência (RNP - MConf) a Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos, assim composta: Carla Zanella Guidini (Presidente/Orientadora), Gabriel Luis Castiglioni (Membro Externo) e Juliana de Souza Ferreira (Membro UFU).

Iniciando os trabalhos, a presidente da mesa apresentou a Comissão Examinadora e o discente, agradeceu a participação do público, e concedeu ao discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do mesmo se deu em conformidade às normas do Programa.

A seguir, a senhora presidente concedeu a palavra aos examinadores, que passaram a arguir o discente. Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos legais, a Banca Examinadora, em sessão reservada, atribuiu o conceito final, considerando o discente:

Aprovado.

Esta defesa de Dissertação de Mestrado Acadêmico integra os requisitos à obtenção do título de Mestre em Engenharia de Alimentos.

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

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



Documento assinado eletronicamente por **Juliana de Souza Ferreira, Professor(a) do Magistério Superior**, em 09/02/2023, às 17:17, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Carla Zanella Guidini, Presidente**, em 09/02/2023, às 17:17, 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 **Gabriel Luis Castiglioni, Usuário Externo**, em 09/02/2023, às 17:19, 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 **4225214** e o código CRC **97F22AA1**.

AGRADECIMENTO

Agradeço à Deus pelo dom da vida, pela saúde e por esta conquista.

À toda minha família Kora Toro pelo amor, apoio e pela atenção.

À minha mãe Lamatou, meu pai Lafía, ao tio Zimé e Kader pelo incentivo, apoio e noites de orações para que tudo desse certo.

À Profa. Carla e Profa. Larissa pela orientação, disposição, paciência e simpatia, pelo carinho e apoio constante, pelos quais tudo foi possível, realizar o meu grande sonho e da minha família. Muito obrigado, que Deus abençoe.

À minha nova amizade que o Mestrado me proporcionou Adrielle, agradeço por ter sido apoio constante e pela parceria.

Ao governo brasileiro pela oportunidade de intercâmbio e ter melhor educação.

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Uberlândia campus Patos de Minas agradeço pela oportunidade concedida.

À coordenação do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Uberlândia Campus Patos de Minas, principalmente à coordenadora Profa. Líbia e a assistente em administração Samira, agradeço pela paciência e apoio.

Agradeço a todos os servidores da Universidade Federal de Uberlândia e seus respectivos familiares, principalmente do campus Patos de Minas pela contribuição e apoio para retirada do meu diploma.

Ao CNPQ pela confiança depositada e suporte financeiro.

Agradeço à banca examinadora por terem aceito o convite e por contribuírem de forma enriquecedora para o trabalho.

Enfim, agradeço a todos que contribuíram para a conclusão desta etapa.

SUMÁRIO

LISTAS DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTA DE EQUAÇÕES	x
LISTA DE SÍMBOLOS	xi
RESUMO.....	xii
<i>ABSTRACT</i>	xiii
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Objetivos.....	2
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 Leite	3
2.2 Intolerância à lactose	3
2.3 Enzima β -galactosidase.....	5
2.4 Imobilização enzimática	6
2.5 Reatores contínuos	10
2.6 Estabilidade da β -galactosidase	11
3 MATERIAL E MÉTODOS	14
3.1 Material.....	14
3.1.1 Unidade experimental	14
Figura 2: Unidade experimental com utilizada, 2A - reator tipo cesta e 2B - reator contínuo.	14
3.1.2 Enzima	15
3.1.3 Suporte para imobilização.....	15
3.2 Métodos experimentais	16
3.2.1 Preparação do substrato e das resinas	16
3.2.2 Processo de imobilização e reticulação.....	16
3.2.3 Método analítico da atividade enzimática.....	17

3.3	Rendimento e eficiência da imobilização	18
3.4	Estudo da estabilidade da β -galactosidase imobilizada em relação à concentração do glutaraldeído	18
3.5	Estudo da estabilidade térmica da β -galactosidase imobilizada com e sem o processo de reticulação	18
3.6	Estudo da estabilidade da enzima imobilizada em relação ao pH com e sem o processo de reticulação	20
3.7	Estudo da estabilidade ao armazenamento da β -galactosidase imobilizada com e sem o processo de reticulação	20
3.8	Estabilidade enzimática na conversão da lactose do permeado de soro de leite em reator contínuo	20
3.9	Conversão da lactose em reator batelado com recirculação do substrato	21
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
4.1	Rendimento, eficiência e recuperação do processo de imobilização	22
4.2	Estabilidade em relação ao reuso da enzima imobilizada com e sem o processo de reticulação	24
4.3	Estabilidade térmica da enzima imobilizada e imobilizada reticulada	28
4.4	Estabilidade ao pH da enzima imobilizada e imobilizada reticulada	43
4.5	Estabilidade ao armazenamento da enzima imobilizada e imobilizada reticulada	45
4.6	Estabilidade enzimática na conversão da lactose do permeado de soro de leite em reator contínuo	47
4.7	Conversão da lactose em reator batelada com recirculação do substrato	50
5	CONCLUSÃO	52
6	SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS	54
	REFERÊNCIAS	55

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1: Métodos de imobilização enzimáticos.	8
Figura 2: Unidade experimental com utilizada, 2A - reator tipo cesta e 2B - reator contínuo.	14
Figura 3: Resinas Duolite A-568 (A) inativada e (B) ativada, utilizada para imobilização da enzima β -galactosidase.	16
Figura 4: Atividade relativa (U/U_0) da β -galactosidase imobilizada, imobilizada e reticulada em 6 usos sucessivos.	25
Figura 5: Atividade residual (%) após 35 dias a 4°C das enzimas imobilizadas e imobilizadas reticuladas usadas 6 vezes sucessivamente.	27
Figura 6: Estabilidade térmica da enzima imobilizada e, imobilizada e reticulada, incubada em tampão BR pH 4 a 30°C (A), 40°C (B), 50°C(C), 55 °C (D) e 60°C (E).	29
Figura 7: Perfil de inativação térmica a 30°C para β -galactosidase imobilizada não reticulada (A) e imobilizada reticulada (B) usando os dois modelos de inativação (Equação 5 e 6).	33
Figura 8: Perfil de inativação térmica a 40°C para β -galactosidase imobilizada não reticulada (A) e imobilizada reticulada (B) usando os dois modelos de inativação (Equação 5 e 6).	34
Figura 9: Perfil de inativação térmica a 50°C para β -galactosidase imobilizada (A) e imobilizada reticulada (B) usando os dois modelos de inativação (Equação 5 e 6).	36
Figura 10: Perfil de inativação térmica a 55°C para β -galactosidase imobilizada (A) e imobilizada reticulada (B) usando os dois modelos de inativação (Equação 5 e 6).	37
Figura 11: Perfil de inativação térmica a 60°C para β -galactosidase imobilizada (A) e imobilizada reticulada (B) usando os dois modelos de inativação (Equação 5 e 6).	39
Figura 12. Ajuste do modelo de Arrhenius aos dados experimentais (valores de kd).	42
Figura 13: Estabilidade da enzima imobilizada e imobilizada reticulada em diferentes valores de pH em tampão BR, 40 mM, depois de 24h a 25°C.	44
Figura 14: Estabilidade da enzima imobilizada (A) e imobilizada reticulada (B) em diferentes valores de pH em tampão BR, 40 mM, durante 90 a 4°C.	46
Figura 15: Estudo da estabilidade da atividade enzimática na conversão global da lactose em reator de leite fixo em regime contínuo com diferente vazão de alimentação A (4 mL/min), B (6 mL/min), C (8 mL/min) e D (4 mL/min).	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Atividade absoluta ($\mu\text{mol}/\text{min}$) da β -galactosidase imobilizada; imobilizada e reticulada em 6 usos sucessivos.	24
Tabela 2 - Ajustes dos dados experimentais aos modelos de desativação térmica de primeira ordem e em série em uma única etapa para β -galactosidase imobilizada sem reticulação.	31
Tabela 3 - Ajustes dos dados experimentais aos modelos de inativação térmica de primeira ordem e em série em uma única etapa para β -galactosidase imobilizada e reticulada.	32
Tabela 4 - Valores de k_d e tempos de meia-vida calculados pelo modelo de primeira ordem de desativação térmica da enzima imobilizada e imobilizada reticulada.	40
Tabela 5 - Influência da vazão na conversão da lactose em reator contínuo.	49
Tabela 6 - Conversão da lactose em reator batelada (vazão 4 mL/min) com recirculação do substrato.	50

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação (1).....	17
Equação (2).....	17
Equação (3).....	18
Equação (4).....	18
Equação (5).....	19
Equação (6).....	19
Equação (7).....	19
Equação (8).....	20
Equação (9).....	20
Equação (10).....	21
Equação (11).....	21

LISTA DE SÍMBOLOS

E_a	Energia de ativação do processo de ativação térmica da enzima
R	Constante da lei dos gases
T	Temperatura absoluta
AE	Atividade enzimática ($\mu\text{mol}/\text{min}$)
U	Atividade enzimática (grama de glicose produzida por litro do meio por minuto por grama de suporte)
GFM	Glicose formada por minuto ($\text{mg}/\text{mL}.\text{min}$)
α	Alfa - formas anoméricas da enzima β -galactosidase
A/A_0	Atividade relativa da enzima
K_d	Constante cinética de desativação térmica
$\ln$	Logaritmo natural
t	t de student
P	Nível de significância
e	Exponencial
$\alpha_l = E_l/E$	Razão entre a atividade específica do estado final (E_l) para uma modelagem de inativação com uma única etapa e a atividade inicial (E)
a	Fator de frequência para a reação
E_d	Energia de ativação do processo de desativação térmica da enzima
$t_{1/2}$	Tempo de meia-vida
τ_{teo}	Tempo de residência
V_R	Volume do reator
v	Vazão de alimentação utilizada
S_0	Concentração de substrato no tanque de alimentação
S_f	Concentração de substrato na corrente de saída sistema

RESUMO

Os produtos lácteos são alguns dos alimentos mais completos e mais consumidos. A intolerância à lactose em grande parte da população mundial leva a produção de produtos sem ou com teor reduzida de lactose utilizando a β -galactosidase. A imobilização enzimática é um processo que permite a recuperação e a reutilização desse biocatalisador, além de aumentar a sua estabilidade operacional. Neste trabalho estudou-se a estabilidade de β -galactosidase de *Bacillus licheniformis* imobilizada por adsorção em resina Duolite A-568 em temperatura ambiente (aproximadamente 25°C), tampão BR com força iônica de 40 mM e pH 4,0 e concentração de enzima de 43 mL/L. A enzima imobilizada foi reticulada com glutaraldeído em diferentes concentrações (2,0 a 3,5 g/L). A estabilidade do biocatalisador imobilizado foi avaliada em relação ao pH na faixa de 3 a 8, à temperatura na faixa de 30 a 60°C e ao armazenamento, por 90 dias. A energia de ativação do processo de desativação térmica da enzima imobilizada também foi determinada. Foi avaliada a taxa de conversão da lactose por enzima imobilizada e imobilizada reticulada em reator batelada com recirculação e diferentes vazões de alimentação. Os resultados de rendimento, eficiência e atividade recuperada da β -galactosidase imobilizada, foram respectivamente de 84%, 99% e 83%. A concentração de glutaraldeído de 2,0 g/L proporcionou melhor estabilidade, mantendo 75% da atividade inicial no sexto uso, e teve sua atividade inalterada quando armazenada por 35 dias. A enzima imobilizada sem reticulação apresentou pH ótimo em 4, enquanto a faixa ótima de pH para enzima imobilizada seguida de reticulação (2,0 g/L) foi de 4 a 7. Em relação à estabilidade térmica a enzima imobilizada e reticulada foi mais estável que a enzima apenas imobilizada em todas as temperaturas avaliadas. O armazenamento afetou mais a atividade da enzima imobilizada (sem reticulação), que apresentou atividade relativa de 27%, em pH 3 e 4 em 90 dias, já a enzima imobilizada e reticulada reteve mais de 70% da atividade inicial durante 90 dias em todos os valores de pH (3 a 8). A energia de desnaturação encontrada para a enzima imobilizada sem reticulação e da enzima imobilizada seguida de reticulação foram de 59.715,32 e 66.063,78 kcal/mol, respectivamente. Em relação à conversão de lactose, a enzima imobilizada reticulada foi mais estável mantendo mais de 50% da sua capacidade de conversão inicial. Com o aumento da vazão na ordem de 2 mL/min observou-se a diminuição da taxa de conversão de cerca de 5%. Em geral a reticulação com glutaraldeído aumentou a estabilidade da β -galactosidase de *Bacillus licheniformis* imobilizada em Duolite A-568. A β -galactosidase de *Bacillus licheniformis* imobilizada pode ser aplicada em vários processos de hidrólise ou de conversão da lactose em condições estudadas.

Palavras-chave: Enzima; Glutaraldeído; Reticulação; Lactose; Conversão.

ABSTRACT

Dairy products are some of the most complete and widely consumed foods. Lactose intolerance in a large part of the world population leads to the production of products without or with reduced lactose content using β -galactosidase. Enzyme immobilization is a process that allows the recovery and reuse of this biocatalyst, besides increasing its operational stability. In this work, the stability of β -galactosidase from *Bacillus licheniformis* immobilized by adsorption on Duolite A-568 resin at room temperature (approximately 25°C), BR buffer with ionic strength of 40 mM and pH 4.0 and enzyme concentration of 43 mL/L was studied. The immobilized enzyme was cross-linked with glutaraldehyde at different concentrations (2.0 to 3.5 g/L). The stability of the immobilized biocatalyst was evaluated with respect to pH in the range of 3 to 8, temperature in the range of 30 to 60°C, and storage for 90 days. The activation energy of the thermal deactivation process of the immobilized enzyme was also determined. The conversion rate of lactose by immobilized and immobilized cross-linked enzyme in a batch reactor with recirculation and different feed rates was evaluated. The results of yield, efficiency and recovered activity of immobilized β -galactosidase were 84%, 99% and 83%, respectively. The glutaraldehyde concentration of 2.0 g/L provided better stability, maintaining 75% of the initial activity on the sixth use, and had its activity unchanged when stored for 35 days. The immobilized enzyme without cross-linking presented pH optimum at 4, while the optimum pH range for immobilized enzyme followed by cross-linking (2.0 g/L) was 4 to 7. In relation to thermal stability the immobilized and cross-linked enzyme was more stable than the immobilized enzyme only at all temperatures evaluated. The storage affected more the activity of the immobilized enzyme (without crosslinking), which presented a relative activity of 27%, at pH 3 and 4 in 90 days, while the immobilized and crosslinked enzyme retained more than 70% of the initial activity during 90 days in all pH values (3 to 8). The denaturation energy found for the immobilized enzyme without crosslinking and the immobilized enzyme followed by crosslinking were 59,715.32 and 66,063.78 kcal/mol, respectively. Regarding lactose conversion, the cross-linked immobilized enzyme was more stable maintaining more than 50% of its initial conversion capacity. With the increase of the flow rate in the order of 2 mL/min a decrease in the conversion rate of about 5% was observed. In general, cross-linking with glutaraldehyde increased the stability of β -galactosidases from *Bacillus licheniformis* immobilized on Duolite A-568. The immobilized β -galactosidase from *Bacillus licheniformis* can be applied in various processes of hydrolysis or lactose conversion under the studied conditions.

Keywords: Enzyme; Glutaraldehyde; Reticulation; Lactose; Conversion.

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, produtos alimentícios sem lactose ou contendo quantidade reduzida dela ganharam importância, tanto a partir de perspectiva comercial e de saúde, impulsionado pela crescente consciência sobre a intolerância à lactose. A alta demanda por produtos sem lactose fez com que as indústrias se reinventassem em seus processos, tornando esses produtos mais acessíveis ao consumidor (VERA et al., 2020).

A β -galactosidase é uma hidrolase que catalisa a quebra de lactose, um dissacarídeo encontrado no leite em dois monossacarídeos, galactose e glicose. A deficiência de β -galactosidase ou baixo nível dela no intestino causa a intolerância à lactose em humanos que enfrentam dificuldades em consumir leite e produtos lácteos (RANI, SHARMA & DEV, 2019).

Também conhecidas como lactases, essas enzimas são amplamente distribuídas na natureza como em microrganismos, plantas e animais, sendo a fonte microbiana (bactérias, fungos e leveduras) a mais utilizada para aplicações industriais, no entanto, ser considerado seguro, é um pré-requisito para o uso em indústrias de alimentos (ELSAYED et al., 2019).

Um microrganismo muito utilizado na produção de β -galactosidase é o *Bacillus licheniformis* que é uma bactéria gram-positiva, formadora de esporos intimamente relacionada ao organismo da espécie *Bacillus subtilis*, que é amplamente utilizado em agricultura como fertilizante probiótico e microbiano. Em vários aspectos da indústria de biotecnologia, esta bactéria é usada na fabricação de enzimas, antibióticos peptídicos e bioquímicos (LIU et al., 2017). É um dos microrganismos mais importantes na produção industrial de enzimas alimentares, como proteases, amilases e lipases, e apresenta segurança na indústria de alimentos (LI et al., 2018).

A enzima beta-galactosidase tem grande importância na indústria alimentícia e farmacêutica (VASUDHA et al., 2023). A utilização da β -galactosidase na forma livre é de apenas uma vez, devido à dificuldade ou impossibilidade de separar a enzima do produto no final do processo. A imobilização da enzima é um processo que permite a reutilização de enzimas, e pode contribuir para redução de custos dos processos que envolvem a enzima livre (FERNANDEZ-LOPEZ et al., 2017). A imobilização pode tornar as enzimas mais resistentes às mudanças de pH, temperatura, pressão e solventes em meio reacional, além de possibilitar o seu emprego em processos contínuos. No entanto, nem todos os protocolos de imobilização tornam as enzimas altamente ativas e estáveis, sendo necessária a escolha adequada do método de imobilização, levando em consideração as propriedades de cada enzima, para se alcançar altas conversões durante longos tempos operacionais (BOLIVAR & GALLEGU,

2020). O uso de enzimas imobilizadas ganhou popularidade nas indústrias de alimentos devido à sua ampla aplicação e otimização de processos. A maioria das aplicações de enzimas imobilizadas é desenvolvida em nível industrial (YUSHKOVA, 2019).

Há um interesse crescente em realizar transformações catalisadas por enzimas em fluxo contínuo. Os processos operados em modo contínuo oferecem vários benefícios, como: reciclagem de substratos, melhoria da produtividade, integração com tecnologias complementares e alinhamento ao processamento *downstream*, evitando problemas causados pela inibição do substrato-produto e, consequentemente permitindo alta conversão e facilidade na recuperação do biocatalisador imobilizado (THOMPSON et al., 2018; HARTLEY et al., 2019). O uso de enzimas imobilizadas em fluxo contínuo pode trazer melhorias na sua taxa de reação, eficiência na remoção e purificação do produto, e melhor controle do processo (BRITTON, MAJUMDAR & WEISS, 2018). Conhecimento sobre as condições de estabilidade de uma enzima facilita seu uso eficiente em vários processos sem inativar o biocatalizador e sem perdas econômicas para indústrias.

1.1 Objetivos

O objetivo geral deste trabalho foi estudar a estabilidade da enzima β -galactosidase de *Bacillus licheniformis* imobilizada e sua aplicação na hidrólise de lactose em reator de leito fixo.

Os objetivos específicos são:

- Avaliar a influência da reticulação na estabilidade operacional da enzima β -galactosidase imobilizada na hidrólise de lactose;
- Avaliar a influência da temperatura e pH na estabilidade da β -galactosidase imobilizada e imobilizada reticulada na hidrólise da lactose;
- Estudar a estabilidade ao armazenamento da β -galactosidase imobilizada e imobilizada reticulada na hidrólise de lactose;
- Estudar a conversão da lactose em reator batelada com recirculação do substrato pela β -galactosidase imobilizada e imobilizada reticulada;
- Avaliar a influência da vazão de alimentação na conversão da lactose em reator de leito fixo em regime contínuo pela enzima β -galactosidase imobilizada e imobilizada reticulada.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Leite

O leite pode ser considerado um dos alimentos mais completos, destacando-se por seu alto valor nutritivo e ser fonte de proteínas, lipídeos, açúcares, sais minerais e vitaminas (MÜLLER & REMPEL, 2021). Segundo Mehta (2015) o leite tem uma composição que gera benefícios para a saúde humana, sendo parte importante de uma dieta saudável e equilibrada. As evidências mostram que os benefícios do leite podem ir além de seus efeitos na saúde óssea, sugerindo um papel potencial na prevenção de doenças crônico-degenerativas (GROSSO, 2017).

O Brasil é um dos maiores produtores de leite no mundo. Em 2021, a produção nacional de leite foi cerca de 35,3 bilhões de litros com um investimento de cerca 68 bilhões de reais (IBGE, 2021). Apenas no segundo trimestre de 2022 o Brasil captou cerca 5,4 bilhões de litros (IBGE, 2022). A cadeia produtiva do leite é uma das principais atividades econômicas do Brasil, com grande destaque na geração de emprego e renda (EMBRAPA, 2019).

Leite e produtos lácteos representam um importante grupo de *commodities* alimentares, de altos valores nutricionais e geralmente consumidos por grande segmento de consumidores, incluindo gestantes, recém-nascidos, crianças e idosos (COSSIGNANI, POLINNI & BLASI, 2019). Os produtos lácteos são produzidos com leites de mamíferos e incluem o leite, creme, manteiga, queijo, iogurte, sobremesas congeladas, soro de leite entre outros e contêm uma coleção variada de micro e macronutrientes (YU & HU, 2018). Os produtos lácteos contêm vários nutrientes e contribuem significativamente para atender às necessidades nutricionais de proteínas, cálcio, magnésio, fósforo, potássio, zinco, selênio, vitamina A, riboflavina, vitamina B-12 e ácido pantotênico (GIL & ORTEGA, 2019). Em adultos, o maior consumo de laticínios foi associado a um menor risco de acidente vascular cerebral (MAZIDI et al., 2019).

2.2 Intolerância à lactose

A intolerância à lactose resulta de uma capacidade reduzida de digerir a lactose ou de uma deficiência da enzima lactase. A intolerância à lactose é um problema naturalmente irreversível. Os principais sintomas gastrointestinais são dor abdominal, náuseas, distensão abdominal, flatulência e diarreia; menos comuns são constipação e vômitos e os sintomas extra-intestinais são dor de cabeça, vertigem, deficiência de memória e letargia (DI COSTANZO & CANANI, 2018). Os sintomas da intolerância à lactose surgem pela

fermentação da lactose não digerida pelas bactérias intestinais *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* e *Streptococcus* (JASIELSKA & GRZYBOWSKA-CHLEBOWCZYK, 2019).

A má absorção de lactose não deve ser confundida com a intolerância à lactose. A má absorção de lactose indica que uma parte da lactose ingerida não é hidrolisada no intestino delgado e atinge o cólon. A deficiência de lactase é quase sempre responsável pela má absorção da lactose (CORGNEAU et al. 2017).

A intolerância à lactose é classificada em deficiência primária e secundária. A deficiência primária de lactase pode ser vista como a "doença genética" mais comum no mundo. Em humanos, naturalmente, após o desmame ocorre uma perda considerável da enzima lactase no intestino. Na deficiência secundária de lactase, a capacidade de digerir a lactose pode ser perdida devido à infecção, cirurgia ou ligada a algumas complicações de doenças ou maus hábitos (DENG et al., 2015).

Cerca de 70% da população adulta mundial tem uma expressão limitada da enzima lactase, que pode variar de uma região a outra ou entre países. Esse problema ocorre por não existência da lactase geneticamente determinada ou a presença de outros distúrbios gastrointestinais (FACIONI et al., 2020). A prevalência da intolerância à lactose varia de acordo com a etnia e está relacionada ao consumo de leite e derivados. A deficiência primária de lactase ocorre com mais frequência entre as populações asiáticas e africanas devido ao baixo consumo de leite e derivados (BAYLESS, BROWN & PAIGE, 2017).

Os sintomas de intolerância à lactose comumente ocorrem quando a pessoa apresenta menos de 50% da atividade da lactase (DENG et al. 2015). A maioria dos indivíduos com intolerância à lactose geralmente exclui o leite e derivados de sua dieta, para evitar as complicações causadas pela intolerância, mesmo que tenham a capacidade de tolerar até 12 g de lactose em dose única e ter boa tolerância a laticínios fermentados (SANTOS, ROCHA & SANTANA, 2019).

O tratamento da intolerância à lactose vai depender da etiologia, se for consequência de hipolactasia primária, o consumo de lactose deve ser evitado temporariamente para que haja remissão dos sintomas (SANTOS, ROCHA & SANTANA, 2019). Uma das principais soluções adotadas pelas indústrias de laticínios para enfrentar a intolerância à lactose é o uso da enzima β -galactosidase exógena para produzir produtos sem lactose ou produtos com baixo teor de lactose. A β -galactosidase também pode ser adicionada na forma líquida ao leite pelo consumidor antes da ingestão, ou ser tomado na forma sólida, juntamente com leite e produtos lácteos (CORGNEAU et al. 2017). A ingestão regular de lactose também pode manter a β -galactosidase ativa no intestino. Embora a expressão da lactase não seja regulada

positivamente por ingestão de lactose, a tolerância pode ser induzida pela adaptação da flora intestinal (DENG et al. 2015).

2.3 Enzima β -galactosidase

A β -galactosidase é uma hidrolase com muitas aplicações importantes na indústria de laticínios e alimentos, especialmente em processos envolvendo hidrólise de lactose, a fim de aumentar a digestibilidade do leite, facilitar o consumo de produtos lácteos para pessoas com intolerância à lactose ou para melhorar as características funcionais dos produtos lácteos. Além de hidrolisar a lactose, também produz galacto-oligossacarídeos pela transferência de resíduos galactosil em moléculas de lactose (ARSALAN et al., 2020). Esta enzima é usada para modificações de produtos alimentícios e farmacêuticos (ANDRADE et al., 2019), na melhoria da doçura em alimentos para controlar a cristalização da lactose (CHANALIA et al., 2018), para a produção de fermentados e bebidas sem álcool (RADIATI et al., 2016), panificação (ZHANG et al., 2017), entre outros.

As enzimas são grupos de proteínas que desempenham funções essenciais no metabolismo, atuando como catalisadoras de processos bioquímicos. Elas são capazes de decompor moléculas complexas em unidades menores, sendo as principais degradadoras da matéria orgânica, originando novos produtos (KOLA et al., 2015). As enzimas são indiscutivelmente uma das biomacromoléculas mais importantes para a vida, excedendo importância frente aos catalisadores artificiais em sua capacidade eficiente de catalisar os sistemas biológicos e as transformações que sustentam a vida (LIAN, 2017).

As β -galactosidases são encontradas em bactérias, fungos e leveduras. Em plantas, é encontrada principalmente em amêndoas, pêssegos, maçãs e damascos. No entanto, em escala comercial e industrial, as fontes mais comumente usadas de β -galactosidase são as microbianas como *Aspergillus* e *Kluyveromyces*. As β -galactosidases de fontes microbianas são mais aplicadas para hidrólise de lactose devido às várias vantagens, incluindo sua alta atividade catalítica, facilidade de obtenção por fermentação, sua estabilidade operacional e possibilidade de aplicação em diversos produtos fermentados. As β -galactosidases de origem microbiana apresentam atividades ótimas em temperatura e pH variando entre 40 e 65°C; e entre 6,0 e 7,2 respectivamente. As enzimas produzidas pelos fungos são altamente estáveis. As fontes fúngicas mais comuns de β -galactosidases são *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces fragilis* (*Saccharomyces fragilis*), e algumas espécies de *Aspergillus* que são aceitas e reconhecidas como seguras. As β -galactosidases fúngica, a maioria possui uma faixa de pH ideal de 3,5–6,5 e temperatura 35–67°C tornando-as mais eficazes para a hidrólise da lactose encontrada em substâncias ácidas como o soro de leite (SAQIB et al., 2017). A

atividade enzimática da β -galactosidase é dependente de fatores ambientais como pH, força iônica do meio e temperatura, da mesma forma que os catalisadores químicos (ZHOU & CHEN, 2001).

Bacillus licheniformis é uma bactéria Gram-positiva amplamente utilizada em vários campos: na agricultura como fertilizante probiótico e microbiano e na indústria de biotecnologia para a produção de enzimas, acetoina e ácido poli- γ -glutâmico (γ -PGA), sendo reconhecido como microrganismo com grande potencial de produzir enzimas como β -galactosidase (ELSAYED et al., 2019), uricase e protease (PAWAR & RATHOD, 2018), amilase (SEWALT, REYES & BUI, 2018), quitinase (AKEED, ATRASH & NAFFAA, 2020), glutaminase, queratinase (ABDEL-FATTAH et al., 2018), lacase (LI et al., 2021), β -lactamase (LI et al., 2020), liquenase (GAO, 2016), lipase (MALEKABADI, BADOEI-DALFARD & KARAMI, 2018), mananase (GE et al., 2016) e pectinase (BIBI, ALI & TABASSUM, 2016). Algumas cepas de *B. licheniformis* crescem em temperaturas elevadas e produzem enzimas, que são ativas em altas temperaturas como a xilanase termofílica (GHOSH, SUTRADHAR & BAISHYA, 2019).

O *B. licheniformis* tem um grande potencial de produção de β -galactosidase que pode atingir cerca de 116 U/mL (ELSAYED et al., 2019). A β -galactosidase de *B. licheniformis* tem alta estabilidade térmica, uma faixa ótima de atividade de 50 a 70°C e valor de pH ótimo 7 (RANI, SHARMA & DEV, 2019). A atividade máxima da β -galactosidase de *B. licheniformis* foi mostrada em pH 6,0 na faixa de temperatura de 55 à 60°C, e a atividade foi superior a 90% na faixa de pH 5,5 a 6,5 (JIN et al., 2014). A β -galactosidase de *B. licheniformis* pode ser utilizada para produção comercial de laticínios sem lactose e galactooligosacarídeos (RANI, SHARMA & DEV, 2019). Kuribayashi et al., (2021) estudaram a imobilização da enzima β -galactosidase de *B. licheniformis* e sua possível aplicação em laticínios. Os autores observaram que a β -galactosidase de *Bacillus licheniformis* imobilizada em Duolite A568 é uma técnica promissora para produzir produtos lácteos sem lactose.

2.4 Imobilização enzimática

A imobilização de uma enzima necessita uma combinação da seletividade, estabilidade e cinética dessa enzima com o aspecto físico e químico, propriedades do suporte a fim de maximizar a estabilidade enzimática. Uma enzima imobilizada é uma enzima que está fisicamente ligada ou confinada em uma matriz insolúvel em água, material de suporte ou transportador (BASSO & SERBAN, 2019).

O uso da técnica de imobilização de enzimas traz muitas vantagens para as indústrias: recuperação e reutilização, operação contínua, facilidade de separação do produto e do

biocatalisador imobilizado, possibilidade de interrupção da reação apenas removendo o biocatalisador imobilizado da solução, possibilidade de iniciar ou continuar a reação a qualquer momento colocando a enzima e o substrato em contato, aumento da estabilidade da enzima, melhoria das suas propriedades e menor propensão a desnaturar, redução do impacto ambiental, processo mais sustentável em comparação com a síntese química (HETTIARACHCHY et al. 2018; BASSO & SERBAN, 2019). Após a imobilização, a estabilidade operacional, em relação à temperatura, pH, agentes químicos e ao armazenamento pode ser melhorada e possibilitar a reutilização desses biocatalisadores (NADAR, VAIDYA & RATHOD, 2020).

Existe uma grande variedade de materiais de várias origens que podem ser usados como suportes para imobilização de enzimas. Esses materiais podem, em geral, ser divididos em orgânicos, inorgânicos e híbridos (compostos de orgânicos e inorgânicos). A escolha do suporte deve considerar algumas condições, como proteger a estrutura da enzima contra condições adversas de reação e assim, ajudar a enzima imobilizada a reter alta atividade catalítica, não deve ter um efeito negativo na estrutura da enzima e não deve perturbar a enzima mais do que é necessário para criar interações estáveis de enzima-matriz (ZDARTA et al., 2018). O suporte deve apresentar estabilidade química, térmica e insolubilidade sob condições de reação (PANDEY, DAVEREY & ARUNACHALAM, 2020).

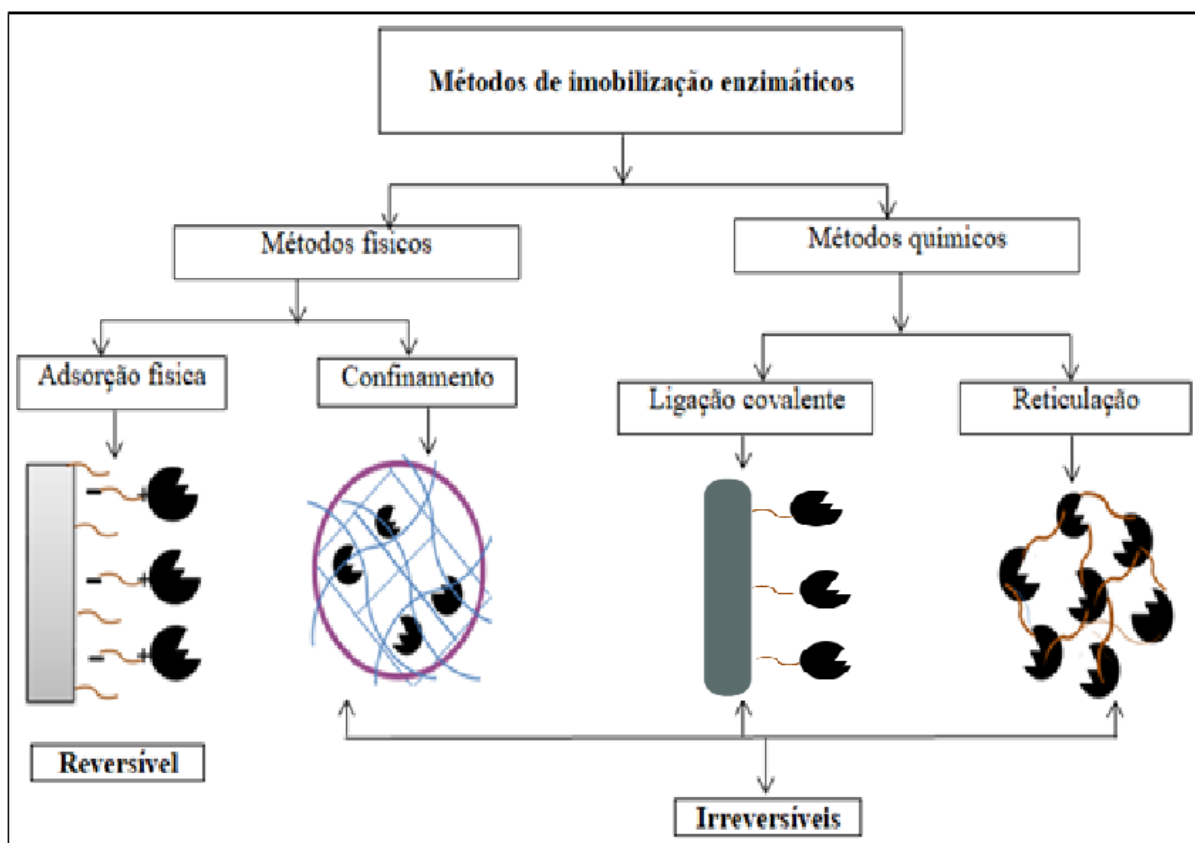
Alguns materiais usados para fabricação de suportes de imobilização são polímeros naturais como: alginato, quitina e quitosana, carragenina, colágeno, gelatina, celulose, amido, pectina e sefarse. Também alguns polímeros sintéticos são usados como suporte de imobilização como: cloreto de polivinila (que impede a inativação térmica da enzima), ciclodextrina, micropartículas de poliuretano derivadas de álcool polivinílico e diisocianato de hexametila; epóxi modificado com ácido fumárico / metacrilado curável por UV entre outros. Outros materiais inorgânicos usados como suporte de imobilização são: zeólitas, cerâmica, celite, sílica, vidro e tanto o carvão ativado natural quanto o modificado com ácido clorídrico (DATTA, CHRISTENA & RAJARAM, 2013).

A resina de troca iônica é um material muito utilizado na imobilização enzimática. Existem resinas com propriedades diferentes utilizadas na imobilização enzimática, como resinas Duolites (ZHANG et al., 2020), resinas Amberlites (BURIAC et al., 2020), resinas Acrílicas (FENG et al., 2020) entre outras. As características de uma resina de troca iônica dependem principalmente da natureza físico-química de seus grupos funcionais (SILVA, HAWBOLDT & ZHANG, 2018). Cada resina tem um grupo funcional específico ou local que confere ligação específica (CHOI et al., 2020). Segundo Basso & Serban (2019) a grande

vantagem do uso de resina de troca iônica para a imobilização enzimática é a possibilidade de ser regenerada aplicando reagentes de baixo custo.

Existem muitos métodos diferentes usados para imobilização de enzimas (Figura 1), mas a indústria tem preferência pelos mais simples e econômicos. A maioria dos métodos usados é baseada em imobilização física e imobilização química (BASSO & SERBAN, 2019). A adsorção e aprisionamento (confinamento) são os métodos físicos de imobilização enzimática nos quais não há interações covalentes entre enzimas e transportadores de suporte, enquanto a ligação covalente e a reticulação são os métodos químicos de imobilização enzimática (LIU, CHEN & SHI, 2018). A imobilização enzimática por ligação covalente, aprisionamento e reticulação são métodos irreversíveis enquanto a imobilização enzimática por adsorção é um método reversível (SNEHA, BEULAH & MURTHY, 2019).

Figura 1: Métodos de imobilização enzimáticos.



Fonte: Autor (2022).

De acordo com Spahn & Minteer (2008) a adsorção enzimática é um método físico de imobilização que resulta de interações hidrofóbicas e ligações salinas. Nesse método o suporte é banhado em enzima para adsorção física ou a enzima é seca nas superfícies dos eletrodos. As enzimas adsorvidas são protegidas da agregação, proteólise e interação com

interfaces hidrofóbicas. A adsorção enzimática é um processo baseado em forças de Van der Waals, interação iônica e pontes de hidrogênio bem como as interações hidrofóbicas, que são forças muito fracas, mas em grande número dão força de ligação suficiente (AHMAD & SARDAR, 2015). As enzimas adsorvidas formam uma camada heterogênea no suporte e a mobilidade das enzimas é limitada por obstáculos estéreis (JIA, NARASIMHAN & MALLAPRAGADA, 2013).

Na imobilização por aprisionamento as enzimas são presas dentro de uma matriz que protege a enzima do contato direto com o meio de reação e torna o material em massa sólido, mas permite que o substrato e o produto se difundam no meio reacional. O aprisionamento enzimático na maioria das vezes é feito com gel, fibras ou por microencapsulação com materiais poliméricos. No aprisionamento a enzima retém a estrutura nativa, pois não ocorrem modificações fortes dentro do material formado (IMAM, MARR & MARR, 2021). Nesse método as restrições físicas geralmente são muito fracas, pode evitar vazamento enzimático por completo (SHELDON, 2007). O aprisionamento por encapsulação desses biocatalisadores é uma possível estratégia para prevenir sua agressão e desnaturação (HOMAEI et al., 2013).

O método de imobilização por ligação covalente consiste em uma ligação covalente entre a enzima e o material de suporte. A ligação covalente acontece entre grupos aminoácidos. A lixiviação enzimática no método de imobilização por ligação covalente é baixa, mas pode afetar a estrutura da enzima (FATHI et al., 2019). Entretanto, a força da ligação da enzima e do suporte depende da presença de diferentes grupos funcionais tais como grupo carboxil, amino, indole, fenólico, sulfidrílico, thiol, imidazole e grupo hidroxila (SIRISHA, JAIN & JAIN, 2016).

A técnica de reticulação é um método de imobilização enzimática que pode ser aplicada com enzima em estado solúvel ou cristalino, usando um agente reticulante químico bifuncional, como o glutaraldeído, reagindo com os grupos NH_2 na superfície da proteína (RIBEIRO et al., 2021). Envolve a fixação de biocatalisadores um ao outro por reagentes multifuncionais formando agregados enzimáticos insolúveis de alto peso molecular. Biocatalisadores imobilizados por reticulação frequentemente sofrem mudanças na conformação (AHMAD & SARDAR, 2015) e normalmente ocorre diminuição do grau de movimento da enzima, que pode diminuir drasticamente a atividade enzimática (SPAHN & MINTEER, 2008).

A atividade catalítica das enzimas, a estabilidade térmica e o pH dependem da escolha do suporte, do método de imobilização adequado e das condições tecnológicas do processo. Os suportes para a imobilização de enzimas precisam ser atóxicos, biocompatíveis, insolúveis

e estáveis nas condições de reação, além de ter alta afinidade para proteínas e grupos funcionais necessários (YUSHKOVA et al., 2019).

Segundo Zhu et al. (2020) a imobilização enzimática deve ser feita de forma adequada, para evitar alterações conformacionais, bloqueio de sítios ativos e resistência à difusão da enzima, que, por sua vez, resulta em perda de atividade. Considerando a diversidade estrutural, complexidade e variabilidade das enzimas, bem como sua sensibilidade às condições ambientais, a seleção das técnicas de imobilização deve ser muito cuidadosa com análises específicas.

2.5 Reatores contínuos

Existem vários tipos de reatores que são utilizados em processos biocatalíticos enzimáticos, podem ser simplificada em reatores contínuos e descontínuos (batelada). Na literatura há quatro configurações de reatores enzimáticos. São eles: os reatores de tanques agitados por batelada; os reatores contínuos de tanques agitados; os reatores de coluna de leito fixo (nos quais o a enzima imobilizada é empacotada permanecendo imóvel enquanto a solução do substrato é bombeada através dela); e a coluna de leito fluidizado (no qual a enzima imobilizada é mantida suspensa por meios de reciclagem da solução do substrato bombeado). As duas últimas configurações podem ser operadas em batelada ou em modo contínuo (POPPE et al., 2015).

O processo em reator contínuo tem muitas vantagens sobre o descontínuo, tais como desempenho de reação devido à remoção contínua do produto. O reator de fluxo contínuo possivelmente aumentaria a eficiência do processo, operando em regime permanente por longo período de tempo (POPPE et al., 2018). Os reatores contínuos são mais adequados para reações mais longas em escalas industriais de produção (SANTANA et al., 2020).

Os processos que envolvem enzimas imobilizadas deveriam ser, preferencialmente, operados continuamente para evitar perda de produtividade (POPPE et al., 2015). Um dos reatores contínuos mais comuns usados em biotecnologia envolvendo enzima imobilizada é o PBR (*packed-bed reactor*), no qual as enzimas imobilizadas são empacotadas em uma coluna através da qual a substrato é bombeado (MATTE et al., 2016).

Há relatos de uso dos reatores contínuos com β -galactosidases imobilizadas tanto para hidrólise da lactose, quanto para processos de transgalactosilação (GUERRERO et al., 2019). Guerrero et al. (2019) utilizaram reator contínuo com β -galactosidase imobilizada de *Aspergillus oryzae* para produção de lactulose que mostrou um rendimento de conversão de 28%. A β -galactosidase de *Bacillus circulans* imobilizada foi utilizada para produção de galactooligossacarídeos em reator contínuos por Rodriguez-Colinas et al. (2016). Os autores

observaram que a concentração máxima de galactooligossacarídeos (24,2 g/L) foi obtida após 48 h de operação, o que correspondeu a 48,6% de conversão de lactose e, portanto, à máxima atividade de transgalactosilação. A estabilidade do biorreator foi satisfatória durante longo período de operação. Aplicação de enzimas imobilizadas em reatores contínuos é muito recomendada em processo de grandes escalas (XAVIER, RAMAN & SAHRMA, 2018).

Além da indústria de alimentos, os reatores contínuos são utilizados em vários processos biotecnológicos para aumentar a produtividade e a estabilidade operacional. Matte et al. (2016) produziram em reator contínuo butirato de butila utilizando lipase *Thermomyces lanuginosus* imobilizada e observaram que o biocatalisador apresentou estabilidade operacional mantendo 63% de sua capacidade de conversão inicial após 30 dias. Na produção de biodiesel, o reator contínuo tem um grande potencial para atingir altos níveis de rendimentos de transesterificação, aumentando a produtividade do biodiesel (COSTA E SILVA et al., 2014).

2.6 Estabilidade da β -galactosidase

As enzimas são biocatalisadores que catalisam quase todas as transformações químicas dentro das células. É muito importante a compreensão das enzimas e da forma como elas respondem às diferentes condições. A temperatura é um dos fatores que afetam a atividade da enzima. Os sítios ativos das enzimas podem ditar o efeito da temperatura sobre a enzima e, consequentemente na sua atividade. Em altas temperaturas ocorre a deformação do sítio ativo da enzima que a leva à perda de atividade (DANIEL & DANSON, 2010). Outro fator é a presença de agentes redutores, por exemplo, pontes de dissulfeto que podem ser quebradas por esses, em valores extremos do pH, as ligações de hidrogênio que são afetadas modificando a estrutura terciária da enzima e resultando perda de atividade (LALANDE et al., 2019).

A estabilidade termodinâmica refere-se à capacidade de uma proteína se desdobrar/redobrar após ser submetida a condições extremas como temperatura elevada, pH extremo ou alta concentração de solvente orgânico. A instabilidade termodinâmica das enzimas é parcialmente atribuída à falta de rigidez dentro da estrutura terciária (BEAUFILS et al., 2021). A enzima livre pode perder sua atividade para pequenas e reversíveis mudanças conformacionais em sua estrutura, mas quando a enzima é imobilizada em suportes inertes mantém sua estrutura química intacta (GARCIA-GALAN et al., 2011). Por exemplo, a imobilização de enzimas dentro de uma estrutura porosa sólida pode permitir que as moléculas enzimáticas sejam totalmente dispersas e sem a possibilidade de interagir com

qualquer interface externa que pode inativar a enzima, assim aumentando sua estabilidade (MATEO et al., 2007).

Segundo Bosso et al. (2016), as variáveis como concentração de enzima, temperatura e pH são alguns dos fatores que afetam a estabilidade e a atividade da enzima β -galactosidase. Os autores estudaram o comportamento da β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* e de *Aspergillus oryzae* em diferentes valores de pH e temperaturas. Eles observaram que a maior taxa de inativação da β -galactosidase de *K. lactis* foi diretamente proporcional ao aumento da temperatura, principalmente a partir de 40°C. Por outro lado, as maiores atividades foram observadas a 40°C e pH 7,0 para a enzima de *K. lactis* e 55°C e pH 5,0 para a enzima *A. oryzae*, mostrando que essa temperatura é limiar entre a maior atividade e o ponto de início de inativação da enzima. Sass & Jorening (2020) observaram que os valores ótimos de pH e temperatura para β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* mudaram de 30°C, pH 4,5 (enzima livre) para 50°C e pH 3,5 (imobilização covalente) e 40°C e pH 3,5 (imobilização por eletrofixação em suspensão).

Khan & Husain (2020) avaliaram a atividade, estabilidade e capacidade de reutilização de β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* imobilizada pelos métodos de ligação covalente e absorção física. Em pH 2, a β -galactosidase adsorvida conseguiu manter 51% da sua atividade e a enzima ligada covalentemente reteve cerca de 68% da sua atividade. Em temperatura de 60°C a β -galactosidase adsorvida reteve 50% da sua atividade e a enzima covalentemente ligada manteve 80% da sua atividade. A β -galactosidase ligada covalentemente reteve 92% da sua atividade mesmo após sua décima reutilização sucessiva, já a enzima adsorvida exibiu apenas 74% de sua atividade inicial. Também foi observada que a enzima imobilizada foi termicamente mais estável que a enzima solúvel que perdeu cerca de 95% da sua atividade a 60°C em 2h de incubação. Portanto, o processo de imobilização pode conferir alta estabilidade à enzima, proporcionando assim uma maior resistência à inativação enzimática pelo calor.

As enzimas β -galactosidas apresentam estabilidade diferente segundo o grau de purificação. A enzima β -galactosidase de *Aspergillus niger* purificada apresentou maior atividade entre pH 2,0 e 5,0, sendo estável e mais ativa em pH 3,0. Enquanto a enzima β -galactosidase de *Aspergillus niger* parcialmente purificada apresentou temperatura ótima de 50°C e pH ótimo de 5,0, sendo estável nessas condições por 15 horas (MARTARELLO et al., 2019).

Klein et al. (2016) em suas pesquisas observaram que a faixa de pH ótimo para a enzima β -galactosidase de *Aspergillus oryzae*, livre foi em torno de 4,5-5,0 enquanto as

enzimas imobilizadas mostraram ter maior atividade em pH 3 e em temperaturas de 55-60°C, preservando mais de 90% de sua atividade depois 60 min de incubação, sendo mais estável quando comparada à enzima livre. A temperatura ótima da β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* livre e imobilizada em partículas de quitosana reticuladas com genipina e em partículas de quitosana reticuladas com glutaraldeído foi encontrada em torno de 55-60°C sem grande variação. Após 540 min de incubação a 60°C a enzima imobilizada ainda apresentava 63% de atividade enzimática residual, enquanto a enzima livre apresentou 16% de atividade enzimática residual após 60 min de incubação nas mesmas condições.

Além da imobilização, a reticulação tem uma grande influência na estabilidade enzimática. Durante a reticulação são formados agregados enzimáticos insolúveis e estáveis, mas devido às possíveis mudanças na conformação da enzima, resulta uma perda de atividade (AHMAD & SARDAR, 2015).

No trabalho de Xu et al. (2020) a enzima β -galactosidase de *Lactobacillus leichmannii* 313 foi imobilizada por reticulação com sulfato de amônio saturado, acetona e isopropanol. A estabilidade ao armazenamento e reutilização foi significativamente melhorada após a imobilização. Além disso, verificou-se que o pH ótimo (7,0) não foi alterado pela imobilização, mas a temperatura ótima passou de 55°C para 60°C para a enzima reticulada com acetona. A concentração do agente reticulante tem grande influência na atividade da enzima imobilizada. No trabalho de Kuribayashi et al. (2021) a reticulação com glutaraldeído na concentração de 1g/L não afetou a atividade da β -galactosidase de *Bacillus licheniformis* imobilizada, enquanto a concentração de 3,5 g/L resultou uma redução de 50% na atividade do biocatalisador, mas apresentou melhor estabilidade que a enzima imobilizada sem reticulação e a reticulada com baixa concentração de glutaraldeído.

Os resultados discutidos anteriormente mostraram que a imobilização tem um impacto positivo na estabilidade enzimática. Para obter um processo eficiente, tanto durante a imobilização, quanto durante o processo operacional, os fatores ambientais com a temperatura e pH do meio devem ser controlados de acordo com a origem do biocatalisador.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

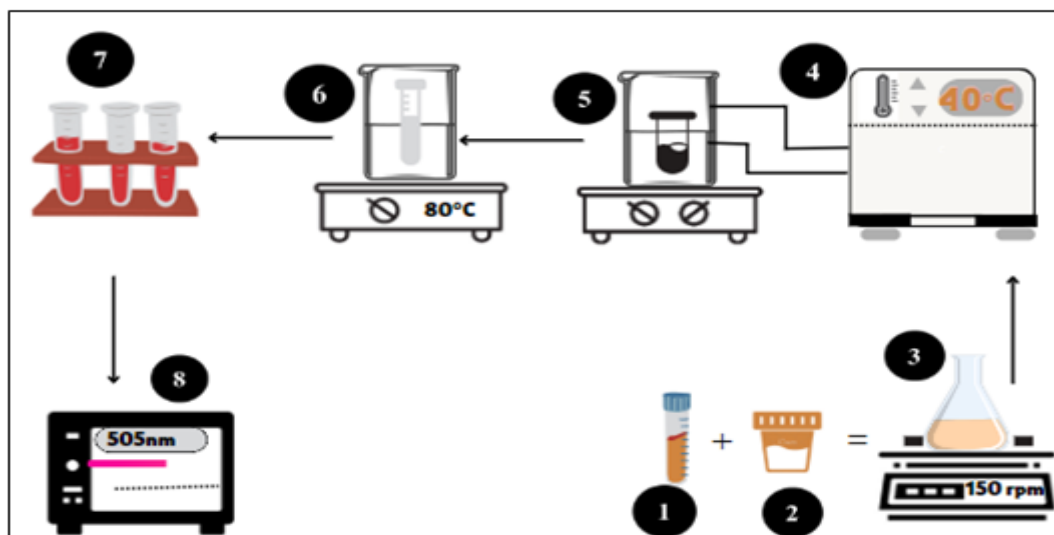
3.1.1 Unidade experimental

A unidade experimental foi montada no Laboratório de Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Uberlândia, *Campus* Patos de Minas, onde foram realizados os experimentos.

O reator de mistura tipo cesta, apresentado na Figura 2A, consistiu em um reator de mistura de volume útil de 250 mL, dotado de uma camisa externa para circulação de água proveniente de banho termostatizado (Solab, Piracicaba-SP, Brasil) para controle de temperatura, submetido à agitação magnética. As partículas de enzima imobilizada foram colocadas dentro de uma cesta de aço inox de 100 mesh, e esta, colocada dentro do reator evitando o atrito entre o agitador e a enzima imobilizada. Na Figura 2B está apresentada a unidade experimental com reator contínuo de leito fixo, dotado de uma camisa externa para circulação de água proveniente de banho termostatizado. As partículas de enzima imobilizada foram compactadas em um tecido fino e colocadas dentro do reator.

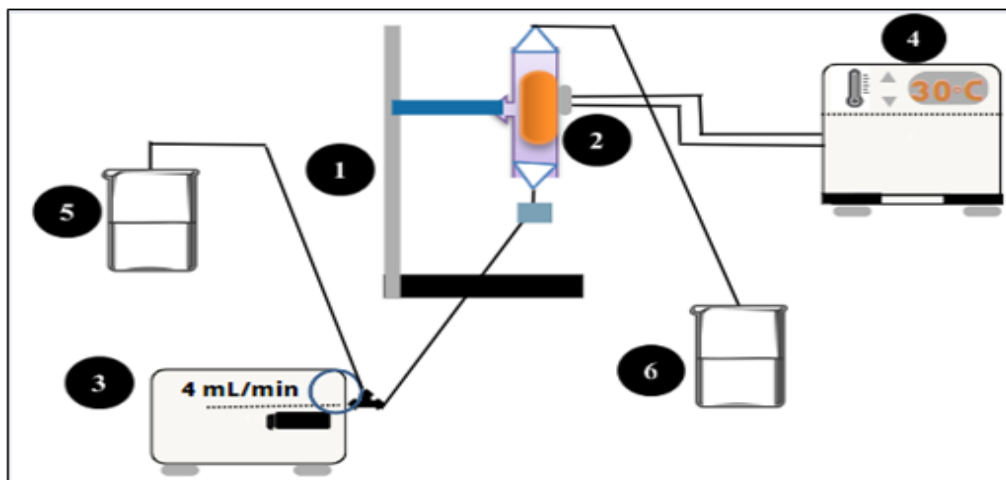
Figura 2: Unidade experimental com utilizada, 2A - reator tipo cesta e 2B - reator contínuo.

2A - Unidade experimental com reator tipo cesta



- | | |
|----------------------|-----------------------------------|
| 1 Solução enzimática | 5 Reator com a enzima imobilizada |
| 2 Resina ativada | 6 Inativação enzimática |
| 3 Imobilização | 7 Teste de glicose-oxidase |
| 4 Banho termostático | 8 Leitura no espectrofotômetro |

2B - Unidade experimental com reator contínuo



Fonte: Autor (2022).

- | | |
|--|-----------------------|
| 1 Suporte do reator | 4 Banho termostático |
| 2 Reator contínuo de leito fixo com a enzima | 5 Corrente de entrada |
| 3 Bomba peristáltica | 6 Corrente de saída |

3.1.2 Enzima

Foi utilizada a enzima β -galactosidase de *Bacillus licheniformis* na forma líquida. Essa enzima é da marca Novozymes (Bagsværd, Dinamarca) e foi cedida pela empresa Granolab/ Granotec Nutrição e Biotecnologia (Araucária-PR, Brasil). De acordo com as recomendações do fabricante as condições ótimas para a enzima na forma livre são na faixa de pH entre 4,2 e 9,0 e temperatura entre 2 e 50°C. A atividade da enzima na forma livre quando em solução na concentração de 43 mL/L foi de 953 U [micromol de glicose produzida por minuto ($\mu\text{mol/min}$)] a 40°C e pH 6,5 (KURIBAYASHI et al., 2021).

3.1.3 Suporte para imobilização

A resina de troca iônica Duolite A-568 utilizada como suporte de imobilização foi cedida, pela *Dow Chemical Company* (Califórnia, Estados Unidos). Essa resina é um trocador aniônico, fracamente básico, baseado em ligação cruzada de fenol-formaldeído, usado como suporte (orgânico sintético) de enzimas em aplicações de bioprocessos. De acordo com *Dow Chemical Company* a resina Duolite A-568 é granulosa de cor verde a cinza com tamanho que varia de 15 a 25 μm e possui uma porosidade de 0,78 a 1,0 mL/g; a matriz da resina é fenol-formaldeído e seu grupo funcional é amina terciária. A densidade da resina Duolite A-568 é 307 g/L, suporta temperatura até 65°C (temperatura máxima), sua faixa de pH é 7,0 a 9,0 e tem uma capacidade total de troca iônica $\geq 1,20$ equivalente/L.

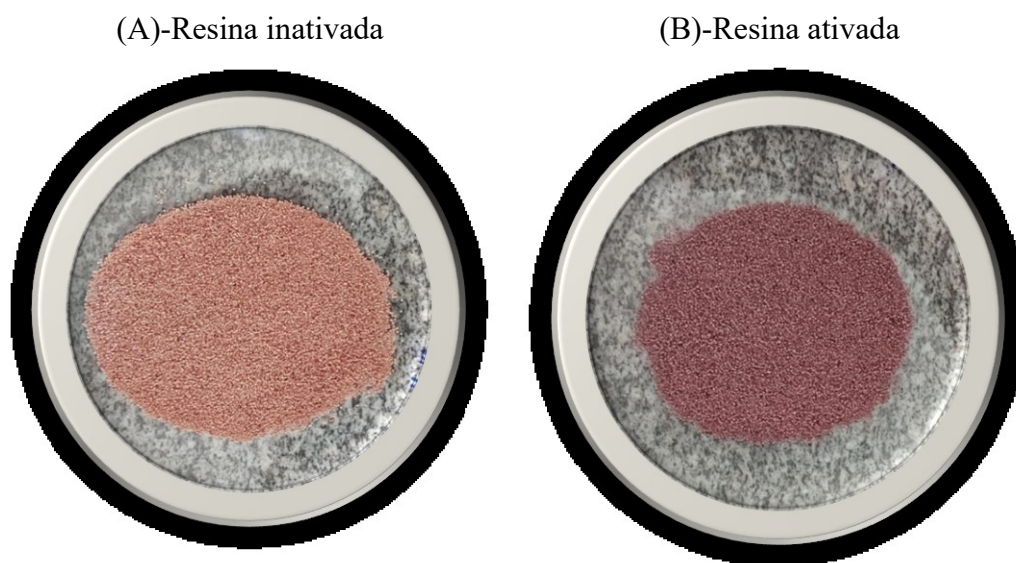
3.2 Métodos experimentais

3.2.1 Preparação do substrato e das resinas

Foi utilizada uma solução de lactose na concentração de 50 g/L como substrato, preparada em solução tampão láctico pH 6,5 com D-lactose Monohidratada da marca Neon.

A resina Duolite A-568 foi ativada de acordo com a metodologia do fabricante: ácido clorídrico 1 M, na razão de dez volumes de solução por volume de resina, durante 30 minutos em incubadora rotativa a 150 rpm. A seguir foi adicionado hidróxido de sódio 1 M, nas mesmas condições e procedimentos realizados para o tratamento ácido. A resina foi lavada com água destilada entre os tratamentos. No final do processo a resina foi lavada com água destilada, filtrada à vácuo e seca à temperatura ambiente (aproximadamente 25°C). A resina nas suas formas inativada e ativada é ilustrada na Figura 3.

Figura 3: Resinas Duolite A-568 (A) inativada e (B) ativada, utilizada para imobilização da enzima β -galactosidase.



Fonte: Autor (2023).

3.2.2 Processo de imobilização e reticulação

A imobilização por adsorção foi o método adotado neste trabalho. O processo de imobilização foi realizado utilizando uma massa de 0,5 g de resina ativada, incubada em 10 mL de solução enzimática, preparada em tampão BR (composto por ácido bórico, ácido fosfórico e ácido acético) com força iônica de 40 mM e pH 4,0, concentração enzimática de 43 mL/L. O tampão BR foi preparada de acordo com Gomes et al., (2020). A mistura foi colocada em agitação de 150 rpm em mesa rotativa à temperatura ambiente (aproximadamente 25°C) durante 2 horas (GUIDINI et al., 2010). Depois do processo de

imobilização o biocatalisador foi recuperado por filtração, lavado com tampão láctico pH 6,5 e armazenado a 4°C em tampão BR pH 4,0.

O processo de reticulação neste trabalho foi entre enzimas imobilizadas, realizado pela imersão do biocatalisador imobilizado em 5 mL de solução de glutaraldeído (concentração variável de acordo com o experimento) e mantido por 1,5 horas nas mesmas condições de agitação e de temperatura que o processo de imobilização. Depois do processo de reticulação o biocatalisador foi recuperado por filtração, lavado com tampão láctico pH 6,5 e armazenado a 4°C em tampão BR pH 4,0.

3.2.3 Método analítico da atividade enzimática

A atividade enzimática foi determinada através do método das taxas iniciais de reação de hidrólise de lactose, determinando a quantidade de glicose formada por minuto.

A reação de hidrólise para determinação da atividade ocorreu a 40°C, com um volume de 75 mL de substrato, com concentração de lactose de 50 g/L, preparado em tampão láctico pH 6,5, adaptado de Guidini et al. (2010) e Falleiros et al. (2017). Para cada experimento foram tomadas cinco amostras do meio reacional em intervalos de tempo de 3 minutos, totalizando 15 minutos de reação. Cada amostra foi colocada em um tubo de ensaio, o qual foi tampado e imediatamente colocado em um banho de água à 80°C, por 10 minutos, necessário para inativar qualquer atividade enzimática. A quantificação da glicose foi realizada pelo método enzimático-colorimétrico (glicose-oxidase) com leitura no comprimento de onda de 505 nm em espectrofotômetro. As leituras foram realizadas em triplicata para uma maior confiabilidade nos resultados obtidos. Para o cálculo da concentração de glicose em mg/dL foi utilizada a Equação 1, recomendado pelo fabricante:

$$Glicose = \frac{Absorbância\ teste}{Absorbância\ padrão} \times 100\ mg.dL^{-1} \quad \text{Equação (1)}$$

A unidade de atividade enzimática U foi definida como micromol de glicose produzida por minuto ($\mu\text{mol}/\text{min}$). A atividade enzimática foi determinada pelo método das taxas iniciais da reação de hidrólise de lactose, conforme descrito por Santiago et al. (2004). Para o cálculo da atividade enzimática (seja na forma livre ou imobilizada) foi seguida a Equação 2:

$$AE = \frac{GFM}{0,18} \times V_R \quad \text{Equação (2)}$$

Onde:

AE = Atividade enzimática ($\mu\text{mol}/\text{min}$);

GFM = Glicose formada por minuto ($\text{mg}/\text{mL}.\text{min}$) (Equação 1);

0,18 = Massa molar da glicose ($\text{mg}/\mu\text{mol}$);

V_R = Volume total do reator (mL).

3.3 Rendimento e eficiência da imobilização

O rendimento e a eficiência da imobilização foram determinados pelas Equações 3 e 4, respectivamente, como descrito por Sheldon e Van Pelt (2013).

$$\text{Rendimento de imobilização} = 100 \times \frac{\text{Atividade imobilizada}}{\text{Atividade inicial}} \quad \text{Equação (3)}$$

$$\text{Eficiência de imobilização} = 100 \times \frac{\text{Atividade observada}}{\text{Atividade imobilizada}} \quad \text{Equação (4)}$$

Onde:

Atividade imobilizada = Atividade da enzima livre – Atividade do sobrenadante;

Atividade inicial = Atividade da enzima livre;

Atividade observada = Atividade da enzima imobilizada.

3.4 Estudo da estabilidade da β -galactosidase imobilizada em relação à concentração do glutaraldeído

Nesta etapa foi estudada a estabilidade da enzima imobilizada e reticulada com diferentes concentrações de glutaraldeído de 2,0; 2,5; 3,0 e 3,5 g/L. Ao final dos processos de imobilização e reticulação com cada concentração de glutaraldeído, os biocatalisadores imobilizados foram recuperados por filtração em papel filtro, lavados com tampão láctico e utilizados sucessivamente (por 6 vezes). As enzimas foram armazenadas a 4°C durante 35 dias em tampão BR pH 4 para posterior avaliação da atividade residual. As atividades no sexto uso foram consideradas como atividades iniciais para calcular as atividades residuais após os 35 dias. A atividade enzimática para cada utilização foi determinada pelo método das taxas iniciais de reação.

3.5 Estudo da estabilidade térmica da β -galactosidase imobilizada com e sem o processo de reticulação

O estudo da estabilidade térmica tanto para enzima imobilizada quanto para enzima imobilizada e reticulada foi realizado em cinco temperaturas diferentes (30, 40, 50, 55 e 60°C). Para cada temperatura de incubação, os conjuntos de enzimas imobilizadas e

imobilizadas reticuladas foram mantidos no banho termostatzado em intervalos adequados de tempo, totalizando 5 pontos: 1 hora para 30°C, 20 minutos para 40°C, 15 minutos para 50°C, 5 minutos para 55°C e 2 minutos para 60°C. Os tempos de incubações foram definidos depois de testes prévios. As amostras depois do tempo de incubação foram resfriadas rapidamente em banho de gelo e determinada a atividade residual pelo método das taxas iniciais de reação. Os resultados de atividade enzimática residual em função do tempo de incubação, para cada temperatura, foram ajustados aos modelos de inativação térmica de primeira ordem (Equação 5), e pela modelagem de inativação enzimática com um estágio (Equação 6). Os ajustes foram realizados pelo método numérico de Levenberg Marquardt, utilizando o *software Statistica*® 7.0 segundo Moré & Watson (1977), para determinar os parâmetros cinéticos pelos melhores ajustes segundo Henley e Sadana (1985).

$$\frac{A}{A_0} = e^{(-K_d \cdot t)} \quad \text{Equação (5)}$$

$$\frac{A}{A_0} = (1 - \alpha_1)e^{(-K_d \cdot t)} + \alpha_1 \quad \text{Equação (6)}$$

Sendo:

$\frac{A}{A_0}$ é a atividade relativa;

A = atividade enzimática,

A_0 = atividade enzimática em relação à inicial,

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

k_d = constante cinética de inativação.

Os tempos de meia vida foram determinados para cada temperatura, considerando o melhor ajuste dos dados experimentais às Equações de inativação térmica (Equações 5 e 6) utilizando a Equação 7 e 8, para os modelos de inativação térmica de primeira ordem e em série com uma única etapa, respectivamente. A energia de ativação do processo de inativação térmica foi calculada pela Equação 9 por uma regressão linear.

$$t_{1/2} = -\frac{\ln(0,5)}{k_d} \quad \text{Equação (7)}$$

$$t_{1/2} = -\frac{1}{k_d} \ln \left(\frac{\frac{A}{A_0} - \alpha}{1 - \alpha} \right) \quad \text{Equação (8)}$$

$$\ln(k_d) = \ln \alpha - \frac{E_d}{R} \cdot \frac{1}{T} \quad \text{Equação (9)}$$

Sendo:

k_d = constante cinética de inativação;

α = fator de frequência para a reação;

E_d = energia de ativação do processo de inativação térmica;

T = temperatura absoluta;

R = constante da lei dos gases.

3.6 Estudo da estabilidade da enzima imobilizada em relação ao pH com e sem o processo de reticulação

A estabilidade ao pH foi avaliada em solução tampão BR 40 mM na faixa de pH de 3 a 8 em temperatura ambiente e a atividade foi determinada conforme descrito na seção 3.2.3.

3.7 Estudo da estabilidade ao armazenamento da β -galactosidase imobilizada com e sem o processo de reticulação

A estabilidade ao armazenamento da β -galactosidase imobilizada e imobilizada reticulada foi avaliada em tampão BR de diferentes valores de pH durante 90 dias a 4°C. As soluções tampões foram de pH 3, 4, 5, 6, 7 e 8. Depois de 24h as primeiras atividades foram avaliadas e posteriormente a cada 30 dias. As diferentes amostras de enzimas correspondente foram filtradas e lavadas com tampão láctico de pH 6,5 e em seguida as atividades foram avaliadas. A atividade enzimática foi determinada conforme a seção 3.2.3.

3.8 Estabilidade enzimática na conversão da lactose do permeado de soro de leite em reator contínuo

Foi avaliada a conversão de lactose do permeado de soro de leite pela β -galactosidase imobilizada e imobilizada reticulada em reator de leito fixo operando em regime contínuo sem reciclo. Utilizou-se permeado de soro de leite preparado conforme item 3.2.1. Para avaliar a influência da vazão foram utilizadas quatro diferentes vazões, sendo elas de 4, 6, 8 e 10 mL/min, em temperatura de reação de 30°C durante 6 horas. As amostras foram retiradas a cada hora completando 6 coletas. A conversão global foi calculada segundo a Equação 10.

$$Convers\tilde{a}o_{Global}(\%) = \frac{S_o - S_F}{S_o} \times 100 \quad \text{Equa\~{c}\~{a}o (10)}$$

Onde:

S_o = Concentra\~{c}\~{a}o de substrato no tanque de alimenta\~{c}\~{a}o,

S_f = Concentra\~{c}\~{a}o de substrato na corrente de sa\~{i}da sistema.

O tempo de resid\~{e}ncia foi calculado de acordo com a Equa\~{c}\~{a}o 11.

$$\tau_{teo} = \frac{V_R}{v} \quad \text{Equa\~{c}\~{a}o (11)}$$

Onde:

τ_{teo} = Tempo de resid\~{e}ncia (min)

V_R = Volume do reator (mL)

v = Vaz\~{a}o de alimenta\~{c}\~{a}o (mL/min)

3.9 Convers\~{a}o da lactose em reator batelado com recircula\~{c}\~{a}o do substrato

A convers\~{a}o de lactose do permeado de soro de leite pela β -galactosidase imobilizada e imobilizada reticulada com recircula\~{c}\~{a}o do substrato em reator de leito fixo, batelado, foi estudada durante 25 horas com vaz\~{a}o de 4 mL/min (considerando menor vaz\~{a}o) . As amostras foram retiradas a cada hora. Foi utilizada 500 mL de solu\~{c}\~{a}o de lactose. A convers\~{a}o global foi calculada segundo a Equa\~{c}\~{a}o 10.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Rendimento, eficiência e recuperação do processo de imobilização

A imobilização foi realizada utilizando a resina de troca iônica Duolite A-568 em temperatura ambiente (aproximadamente 25°C), tampão BR com força iônica 40 mM, pH 4,0 e concentração enzimática 43 mL/L. O rendimento da imobilização nessa condição foi 84%. O rendimento pode variar de acordo com o método de imobilização e as condições em que ocorreu. O rendimento da imobilização da β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* em agarose a 30°C em tampão fosfato 10 mM, pH 7 foi 76% (SEREY et al, 2021).

Falleiros et al. (2017) observaram que em um mesmo método de imobilização uma simples lavagem em cada etapa de imobilização pode afetar o rendimento da imobilização. A imobilização foi realizada com enzima β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* em resina de troca iônica Duolite A568 e foi obtido 88% de rendimento e usando o mesmo método e aplicando lavagem em cada etapa de imobilização o rendimento diminuiu para 75%. Como neste trabalho não houve lavagem em cada etapa de imobilização, o rendimento encontrado (84%) corrobora com o resultado de Falleiros et al. (2017) na condição sem lavagem (88%).

Para Neto et al. (2021), o rendimento da imobilização pode variar de acordo com o tipo de suporte e o tratamento do suporte. Eles observaram que o rendimento da imobilização da β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* foi de 97,50% em quitosana ativada com glutaraldeído; 38,59% em agarose ativada por glicedol e 60,54% em agarose ativada com glicidol e revestida com polieterimida (PEI). Os resultados deles foram diferentes comparados ao encontrado neste trabalho uma vez que os suportes de imobilização usados foram diferentes. Segundo Gennari et al. (2022) as características como as cargas dos suportes, provocam diferentes interações entre a enzima e os suportes, interferindo diretamente no rendimento. Os autores observaram diferentes rendimentos da imobilização da β -galactosidase em celulose em função da carga enzimática. O maior rendimento foi 63% (imobilização em celulose com cargas de 20 e 30 U/g de suporte), baixo resultado de rendimento ao se comparar com o encontrado no presente trabalho.

A eficiência da imobilização da β -galactosidase observado neste trabalho foi 99% considerando as condições da imobilização descritas anteriormente. Como o rendimento (ver item 4.1), a eficiência da imobilização também é diretamente influenciada pelas condições do processo. A lavagem em cada etapa da imobilização é um fator que impacta na eficiência do processo. No trabalho de Falleiros et al. (2017) a eficiência da imobilização da β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* em resina de troca iônica Duolite A-568 diminuiu de 86%

para 81% devido à lavagem entre cada etapa da imobilização. O resultado da eficiência dos autores está de acordo com o resultado obtido neste trabalho considerando o processo de imobilização sem lavagem. A eficiência da imobilização é afetada pelo método da imobilização, uma vez que a mesma enzima β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* (FALLEIROS et al., 2017) foi imobilizada por ligação cruzada usando genipina a eficiência foi de 66% e usando glutaraldeído foi de 36% (KLEIN et al., 2016).

De acordo com Eskandarloo e Abbaspourrad (2018), a concentração enzimática pode também interferir na eficiência da imobilização, o aumento da concentração de β -galactosidase de 2 para 14 mg/mL resultou em uma diminuição na eficiência de imobilização da β -galactosidase na superfície das esferas de vidro de 80,2% para 13,9%, respectivamente. Neste trabalho a concentração da solução enzimática para imobilização foi baixa, 43 mL/L (0,43 mL de enzima para 10 mL da solução tampão BR pH 4), uma concentração menor que 2 mg/mL, isso justifica a maior eficiência (99%) obtida nesta pesquisa. Segundo Gennari et al. (2022) as cargas dos suportes interferem na eficiência da imobilização enzimática, devido às diferentes interações entre a enzima e os suportes. Os autores observaram diferentes eficiências de imobilização da β -galactosidase em celulose com cargas diferentes. A melhor eficiência (aproximadamente 90%) foi observada em celulose com cargas de 20 e 30 U/g de suporte.

A atividade recuperada de uma enzima é dependente de vários fatores, pois a imobilização e a atividade de uma enzima são influenciadas por diversos parâmetros. A atividade recuperada da imobilização pode ser afetada pelo tipo de suporte e o tipo de tratamento, as atividades recuperadas da imobilização da β -galactosidase foram: 3,59% em quitosana ativada com glutaraldeído; 3,62% em agarose ativada por glicidol e 2,30% em agarose ativada com glicidol e revestida com polietilenimina no trabalho de Neto et al. (2021). O resultado de atividade recuperada no presente estudo foi de 83% em resina Duolite A-568, foi maior que os resultados de Neto et al. (2021).

Quando a β -galactosidase de *Lactobacillus leichmannii* 313 (LL 313) foi imobilizada pelo método de reticulação usando diferentes agentes reticulantes os resultados foram diferentes. As atividades recuperadas foram 23% para sulfato de amônio saturado, 18% para acetona e 13,6% para isopropanol no trabalho de Xu et al. (2020). Os resultados mostraram que no mesmo método de imobilização (reticulação) o tipo de reagente pode afetar a atividade recuperada. Portanto, pode-se observar que diferentes métodos de imobilização podem gerar diferentes resultados de atividades recuperadas, da eficiência e do rendimento da

imobilização. Este estudo mostrou que a escolha do método e suporte de imobilização levaram a rendimento e eficiência iguais ou superiores aos relatados na literatura.

4.2 Estabilidade em relação ao reuso da enzima imobilizada com e sem o processo de reticulação

Os resultados de estabilidade em relação ao reuso da β -galactosidase de *Bacillus licheniformis* imobilizada (com e sem reticulação) são apresentados na Tabela 1 e na Figura 4.

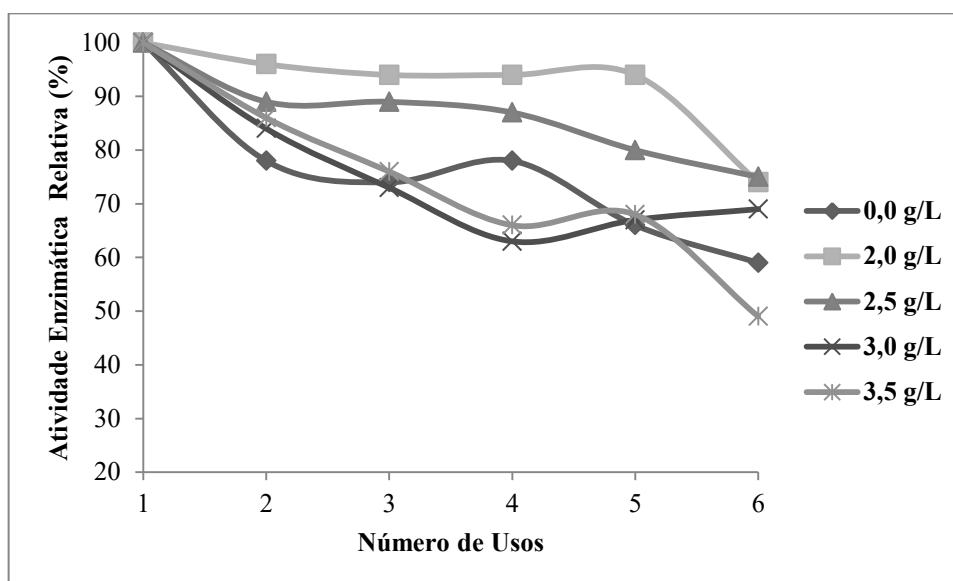
Analisando a Tabela 1 observa-se que as enzimas reticuladas apresentaram baixos valores de atividade, apresentaram menos de 50% de atividade em relação à enzima não reticulada. Considerando o primeiro uso, o aumento da concentração do glutaraldeído de 2,0 para 3,5 g/L resultou uma diminuição de 29,44% na atividade enzimática. Observa-se quanto mais alta for a concentração do glutaraldeído mais é a diminuição da atividade enzimática. Segundo Wahab et al. (2019) a diminuição da atividade enzimática quando reticulada pode ser devido à excessiva ligação cruzada induzida pelo glutaraldeído que torna a enzima mais rígida e reduz sua flexibilidade de alcançar o substrato.

Tabela 1- Atividade absoluta ($\mu\text{mol}/\text{min}$) da β -galactosidase imobilizada; imobilizada e reticulada em 6 usos sucessivos.

Concentração de Glutaraldeído (g/L)	1° uso	2° uso	3° uso	4° uso	5° uso	6° uso
0,0 (imobilizada sem reticulação)	756 $\pm$ 3	589 $\pm$ 9	556 $\pm$ 17	590 $\pm$ 27	497 $\pm$ 13	444 $\pm$ 14
2,0	326 $\pm$ 6	312 $\pm$ 0	306 $\pm$ 0	306 $\pm$ 2	308 $\pm$ 2	242 $\pm$ 6
2,5	326 $\pm$ 4	290 $\pm$ 2	290 $\pm$ 2	284 $\pm$ 0	269 $\pm$ 12	246 $\pm$ 4
3,0	268 $\pm$ 4	226 $\pm$ 2	196 $\pm$ 0	168 $\pm$ 16	180 $\pm$ 0	184 $\pm$ 2
3,5	230 $\pm$ 0	198 $\pm$ 6	174 $\pm$ 2	152 $\pm$ 6	156 $\pm$ 2	112 $\pm$ 2

Analisando a Figura 4 é possível observar que a enzima imobilizada reticulada com glutaraldeído sofreu menor queda em relação à sua atividade inicial, após 6 usos sucessivos quando comparada a enzima imobilizada sem reticulação (exceto o biocatalisador reticulado com glutaraldeído à 3,5 g/L). As enzimas reticuladas com 2,0; 2,5 e 3,0 g/L de glutaraldeído foram mais estáveis, mantendo respectivamente 74, 75 e 69% de suas atividades iniciais no sexto uso, quando comparado com a enzima apenas imobilizada que reteve 59% da atividade inicial. Esses resultados mostram que a reticulação com glutaraldeído foi eficaz na manutenção da estabilidade da enzima imobilizada considerando a atividade no primeiro uso de cada enzima.

Figura 4: Atividade relativa (U/U_0) da β -galactosidase imobilizada, imobilizada e reticulada em 6 usos sucessivos.



O efeito do glutaraldeído na estabilidade da β -galactosidase de *Bacillus licheniformis* imobilizada foi confirmado na pesquisa da Kuribayashi et al. (2021). No estudo destes pesquisadores foi usada uma concentração de glutaraldeído de 3,5 g/L que se mostrou eficaz na manutenção da estabilidade da enzima imobilizada relacionada ao número de ciclos de uso. Neste trabalho a concentração de glutaraldeído de 2,0 g/L mostrou atividade enzimática mais estável mantendo mais de 90% da sua atividade inicial em 5 usos sucessivos, reteve mais atividade que as demais concentrações.

Em 7 usos sucessivos da β -galactosidase de *Lactobacillus plantarum* HF571129 imobilizada e imobilizada reticulada com 0,5% do glutaraldeído, Selvarajan et al. (2015) observaram no final do ciclo que a enzima reticulada apresentava 81% de sua atividade inicial, enquanto a enzima apenas imobilizada manteve 75%. Yu e O'Sullivan (2018) observaram uma queda consideravelmente gradual na atividade hidrolítica de β -galactosidase de *Lactococcus lactis*, imobilizada em quitosana, apresentando aproximadamente 20% da sua atividade inicial no sexto uso. Essa perda de atividade da enzima apenas imobilizada ao longo de reuso, também foi observada neste trabalho, cerca de 40% de atividade perdida no sexto uso.

Albuquerque et al. (2018) imobilizaram a β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* em quitosana ativada com glutaraldeído (0,8%) e observaram que a enzima manteve cerca de 50% da sua atividade inicial no sexto uso. No trabalho desses autores o glutaraldeído foi utilizado apenas para ativar o suporte, enquanto nesta pesquisa a enzima e o suporte juntos

foram reticulados tendo maior efeito de reticulação. Os resultados de estabilidade ao ciclo de uso encontrados, também, corroboram com aqueles encontrados por Guidini et al. (2010). A atividade residual da enzima imobilizada sem reticulação foi de 51% de sua atividade inicial após 30 usos, enquanto o valor da atividade residual da enzima imobilizada seguida da reticulação foi de 90% da atividade inicial (GUIDINI et al., 2010).

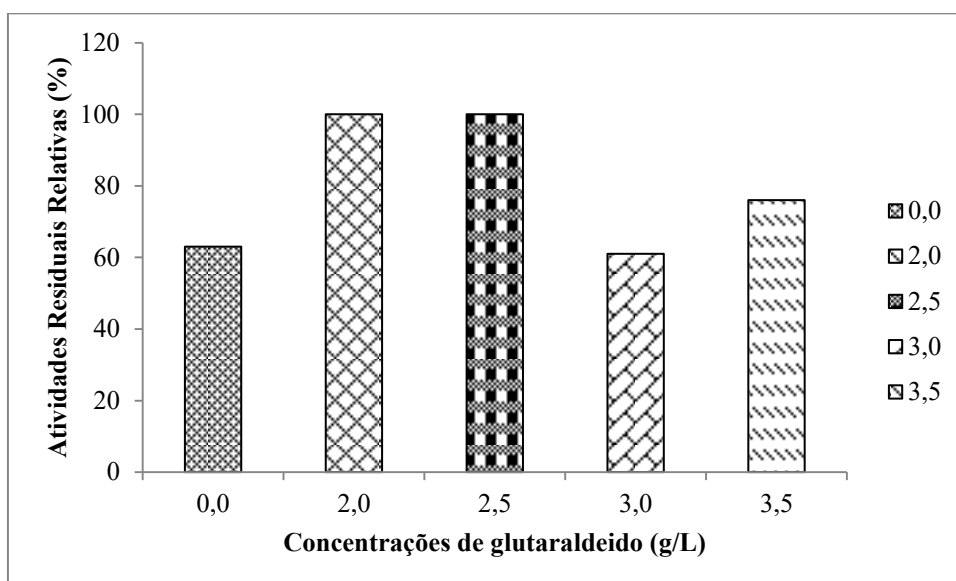
O efeito do agente reticulante bifuncional como o glutaraldeído depende da sua concentração. Quanto maior for a concentração do glutaraldeído maior será a formação de ligação cruzada e grandes agregados enzimáticos serão formados provocando a diminuição da atividade enzimática (WAHAB et al., 2019). A melhor concentração de glutaraldeído para reticulação de β -galactosidase de *Bacillus licheniformis* observada neste trabalho foi 2,0 g/L, visto que o biocatalisador obtido nesta condição foi muito mais estável (manteve mais de 70% de sua atividade inicial) que os demais, durante o reuso sucessivo.

Grandes concentrações de glutaraldeído durante a reticulação pode afetar a atividade enzimática. Ong e Annuar (2018) verificaram o efeito de diferentes concentrações (1, 2, 3, 4, 5 e 6%) do glutaraldeído na atividade da enzima imobilizada. A atividade enzimática foi máxima na concentração de glutaraldeído de 3% (v/v) e depois dessa concentração houve um decréscimo na atividade enzimática. Segundo estes autores a alta concentração do glutaraldeído pode resultar em agregados muito espessos, levando à blindagem de sítios ativos ou mudanças conformacionais na estrutura da enzima devido à reticulação muito densa, contribuindo para a redução de sua atividade.

Os resultados encontrados neste trabalho provaram essa teoria, quando aumentou a concentração do glutaraldeído de 2,0 g/L para 3,5 g/L a atividade enzimática diminuiu. Križnik et al. (2018) avaliaram diferentes concentrações (de 1 a 3%) do glutaraldeído na reticulação da β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* imobilizada em nanopartículas magnéticas de maghemita e observaram melhor atividade residual em 2,5% do glutaraldeído. O resultado encontrado neste trabalho está de acordo com o resultado dos autores, mostraram mais uma vez que concentração menor que 3,0% do glutaraldeído são suficientes para estabilizar a β -galactosidase.

Após a avaliação da estabilidade ao reuso, resultados discutidos anteriormente, as enzimas imobilizadas e imobilizadas reticuladas com diferentes concentrações de glutaraldeído (depois de 6 usos sucessivos) foram armazenadas à 4°C em tampão BR de pH 4,0 por 35 dias e as atividades residuais após este período estão apresentadas na Figura 5.

Figura 5: Atividade residual (%) após 35 dias a 4°C das enzimas imobilizadas e imobilizadas reticuladas usadas 6 vezes sucessivamente.



Importante lembrar que nesta parte as atividades no sexto uso foram consideradas como atividades iniciais para calcular as atividades residuais após os 35 dias. Observando a Figura 5, pode-se notar que as enzimas reticuladas com 2,0 e 2,5 g/L de glutaraldeído não perderam as suas capacidades hidrolíticas iniciais enquanto o biocatalisador sem reticulação apresentou perda de atividades da enzima, sendo sua atividade residual relativa de 63%. Em relação à enzima reticulada com 3,0 e 3,5 g/L foi observada uma perda de atividade inicial quando comparado com as menores concentrações de glutaraldeído testadas restando respectivamente 61 e 73% da atividade inicial depois de 35 dias a 4°C. A enzima não reticulada apresentou maior atividade residual após 35 dias (280 $\mu\text{mol}/\text{min}$), embora com a maior perda percentual de atividade em relação à inicial. Apesar da baixa atividade das enzimas reticuladas com 2,0; 2,5; 3,0 e 3,5 g/L que apresentaram atividades residuais, respectivamente, 242, 246, 112 e 85 $\mu\text{mol}/\text{min}$, mostraram menores perdas de atividades em relação de suas atividades iniciais em comparação da enzima não reticulada. Selvarajan et al. (2015) observaram que quando a β -galactosidase de *Lactobacillus plantarum* HF571129 imobilizada e imobilizada reticulada com 0,5% do glutaraldeído usada no sétimo dia, a enzima imobilizada e reticulada foi mais estável, apresentando 81% de sua atividade inicial, enquanto que a enzima apenas imobilizada manteve 75% da sua atividade inicial. Os resultados dos autores mostraram a maior estabilidade da enzima imobilizada reticulada e corroboram com os resultados do presente trabalho.

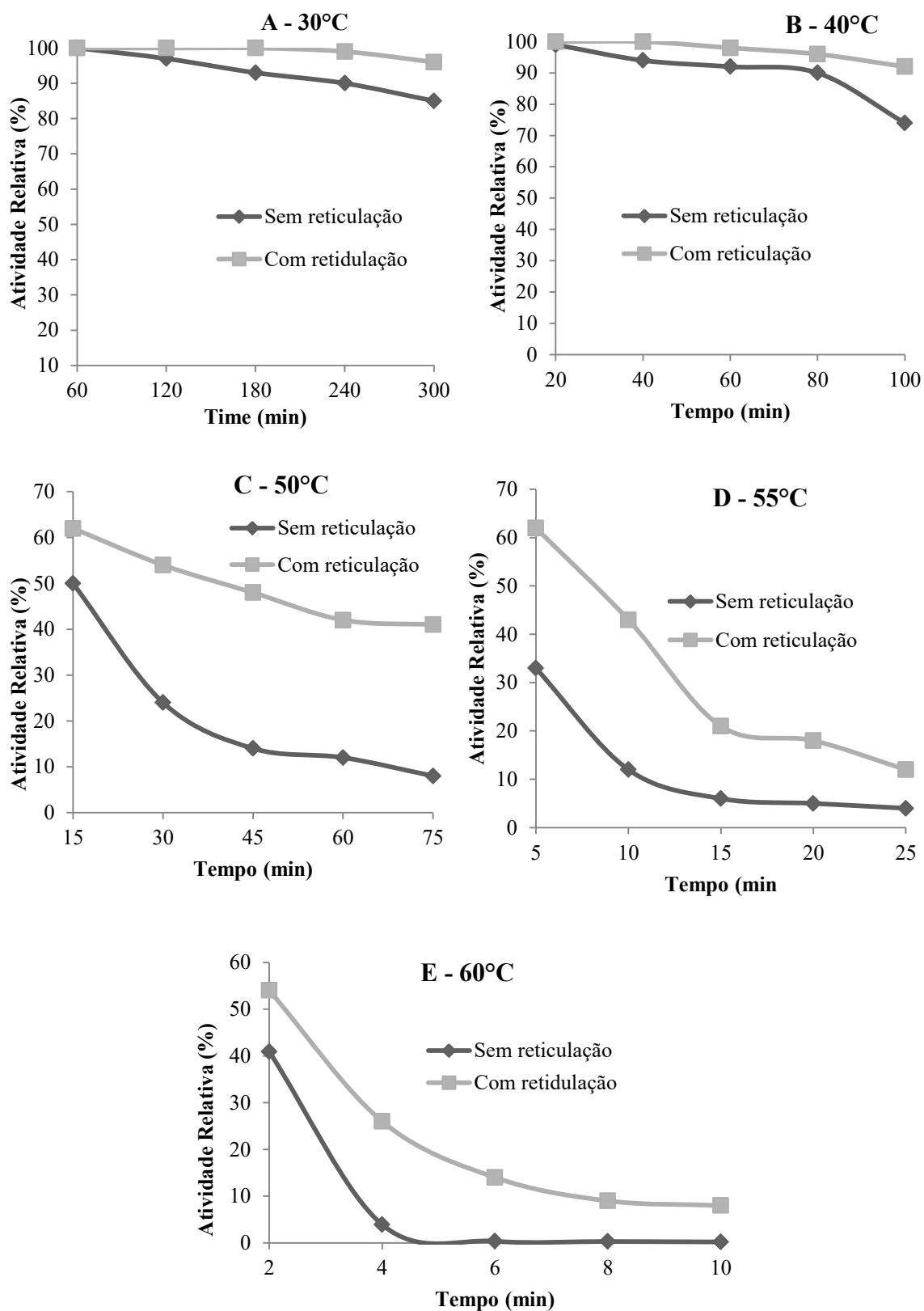
4.3 Estabilidade térmica da enzima imobilizada e imobilizada reticulada

Pela Figura 8 observa-se os perfis de atividade enzimática residual do biocatalisador imobilizado (com e sem reticulação) após incubação em tampão BR de pH 4 em várias temperaturas. A estabilidade térmica da β -galactosidase imobilizada e imobilizada reticulada para cada temperatura (30, 40, 50, 55 e 60°C) é mostrada nas Figuras 8A, 8B, 8C, 8D e 8E, respectivamente. Podemos observar nas Figuras que quanto maior for a temperatura e o tempo de incubação, maior é a perda de atividade. Na condição de 30°C e 40°C (Fig. 8A e 8B), o efeito da temperatura, tanto para enzima imobilizada reticulada, quanto para o biocatalisador imobilizado sem reticulação foi baixa. O efeito da temperatura foi insignificante até 240 e 80 minutos para as temperaturas de 30°C e 40°C, respectivamente, e após este intervalo a perda de atividade foi visível para a enzima não tratada com glutaraldeído (apresentando redução superior de 20% da sua atividade inicial).

Nas temperaturas de 55°C e 60°C (Fig. 8D e 8E) a perda de atividade da β -galactosidase de *Bacillus licheniformis* imobilizada foi maior comparada à perda de atividade nas temperaturas de 30°C, 40°C e 50°C. Em geral, a estabilidade térmica da β -galactosidase imobilizada reticulada foi superior do que a da enzima imobilizada sem reticulação. Por exemplo, na condição de 50°C a enzima imobilizada e reticulada manteve atividade relativa (41%) cinco vezes maior que a enzima sem reticulação (8%), no tempo de incubação de 75 minutos. Em 5 minutos de incubação, a 55°C, a enzima não reticulada reteve 33% de atividade relativa enquanto a enzima reticulada reteve 62%, duas vezes maior. A 60°C, em 4 minutos de incubação a enzima imobilizada reticulada reteve sua atividade relativa de 26% sendo que a enzima imobilizada não reticulada muito menos (3,92%).

Souza et al. (2019) também observaram que em temperatura acima de 50°C, houve perda de atividade catalítica da β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* imobilizada que reteve cerca de 50% a 70°C. Para Falleiros et al. (2017) a perda de atividade da β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* foi acentuada em temperatura acima de 55°C perdendo mais de 50% da atividade em 20 minutos de incubação a 62,5°C e a 65°C.

Figura 6: Estabilidade térmica da enzima imobilizada e, imobilizada e reticulada, incubada em tampão BR pH 4 a 30°C (A), 40°C (B), 50°C(C), 55 °C (D) e 60°C (E).



A maior estabilidade da β -galactosidase imobilizada se deve às possíveis ligações covalentes multipontuais entre a enzima e o suporte, o qual já foi mencionada em vários estudos (SHAFI, AHMED, HUSAIN, 2021; KHAN, HUSAIN, 2020). Quando as enzimas são submetidas às altas temperaturas, as estruturas das cadeias polipeptídicas dessas enzimas podem se romper, provocando a desnaturação enzimática, o que leva à perda da atividade. As interações entre as cadeias polipeptídicas e o suporte podem manter a estrutura da cadeia polipeptídica; portanto, a estabilidade térmica é aumentada (MISSION et al., 2015). Devido à estrutura frágil das enzimas, a alta temperatura pode promover alterações irreversíveis em sua estrutura, reduzindo assim sua atividade catalítica (SOUZA et al., 2019).

Em geral a enzima imobilizada seguida de reticulação com glutaraldeído apresentou maior estabilidade térmica que a enzima imobilizada sem reticulação. O mesmo fenômeno de estabilização com glutaraldeído foi observado por Klein et al. (2016) durante a avaliação da estabilidade térmica da β -d-galactosidase de *Aspergillus oryzae* imobilizada em quitosana. Os autores observaram que após 60 minutos de incubação da β -d-galactosidase imobilizada em quitosana reticulada com genipina e aquela adsorvida seguida de reticulação com glutaraldeído apresentaram, respectivamente, 34% e 44% de atividade enzimática residual.

Os resultados deste trabalho sobre a eficácia do glutaraldeído como bom agente reticulante corroboram com aqueles de Selvarajan, Devi e Doss (2015). A reticulação com glutaraldeído aumentou a estabilidade térmica da β -galactosidase imobilizada em nanopartículas de óxido de zinco com reticulação, quando comparada à enzima sem reticulação. Observou-se que a enzima adsorvida em nanopartículas de óxido de zinco e reticulada com glutaraldeído exibiu 66,77 % de atividade a 70°C, enquanto a enzima adsorvida em nanopartículas reteve apenas 40,61% de atividade residual em condições experimentais semelhantes.

O aumento da estabilidade térmica da enzima imobilizada e reticulada pode ser explicada pela maior exigência de energia de ativação devido a formação das ligações cruzadas, pelo glutaraldeído, que envolvem o grupo amino terminal da enzima (KLEIN et al., 2016; SELVARAJAN, DEVI, DOSS, 2015).

Modelos matemáticos podem descrever o comportamento de estabilidade enzimática. A modelagem matemática consiste em identificar a equação de desativação térmica que mais se ajusta a cada temperatura e a cada protocolo de imobilização. Os coeficientes de determinação para cada equação (Equação 5 e 6) de desativação térmica, com respectivos parâmetros ajustados e análise de significância foram avaliados. Utilizando o teste t de *Student*, adotando como parâmetros significativos os que apresentaram níveis de significância

menores que 5%, estão apresentados na Tabela 2 para a enzima imobilizada sem reticulação e Tabela 3 para a enzima imobilizada seguida de reticulação.

Os resultados obtidos para as duas modelagens de inativação térmica do biocatalisador imobilizado sem reticulação estão apresentados na Tabela 2. A inativação em série em uma única etapa foi inviável para o ajuste a 30, 40 e 60°C. Analisando os resultados, verifica-se que pela Equação 6, nas temperaturas de 30°C, 40°C e 60°C o valor (α_1) foi negativo, sendo -20,8153, -14,3123 e -0,033810, respectivamente e níveis de significância maiores que 5% ($p > 0,05$). Considerando esse fator, o melhor ajuste foi obtido aplicando a modelagem de inativação enzimática com um estágio (Equação 5) para as temperaturas 40°C e 60°C em que apresentaram significância pelo teste t de *Student* ($p < 0,05$). Para as temperatura de 50°C e 55°C os dois modelos de desativação (Equação 5 e 6) se adequaram bem ao ajuste, mas a Equação 6 foi melhor pois apresentou maior coeficiente de determinação para ambas as temperaturas ($R^2=0,99$). Para as temperaturas de 50 e 55°C, que apresentaram valores positivos para o parâmetro α_1 , os níveis de significâncias obtidos foram menores que 5% ($p < 0,05$), tornando-os significativo pelo teste t de *Student* para os dois modelos de inativação.

Tabela 2 - Ajustes dos dados experimentais aos modelos de desativação térmica de primeira ordem e em série em uma única etapa para β -galactosidase imobilizada sem reticulação.

T (°C)	Equação	K_d (min^{-1})	Valor – p	Alpha (α_1)	Valor – p (alpha)	R^2
30	5	0,029807	0,006559	-	-	0,74
	6	0,0013	0,997086	-20,8153	0,997026	0,80
40	5	0,001992	0,008900	-	-	0,70
	6	0,0001	0,994874	-14,3123	0,994536	0,77
50	5	0,043557	0,000152	-	-	0,93
	6	0,054197	0,000131	0,074342	0,014927	0,99
55	5	0,212533	0,000072	-	-	0,95
	6	0,240172	0,000000	0,037220	0,000145	0,99
60	5	0,535909	0,001033	-	-	0,91
	6	0,489406	0,002204	-0,033810	0,408160	0,99

Os resultados obtidos para as modelagens de desativação térmica para o biocatalisador obtido com imobilização seguido de reticulação estão apresentados na Tabela 3. Verifica-se que a desativação enzimática em série, em uma única etapa, e a modelagem de desativação com um estágio (Equação 5 e 6) foram viáveis para o ajuste, apenas a 50°C. Observa-se que a

50°C o valor do parâmetro α_1 foi positivo e o nível de significância foi menor que 5% ($p > 0,05$), tornando-o significativo pelo teste t de *Student*, para os dois modelos matemáticos de desativação. Para as temperaturas de 40, 55 e 60°C apenas a modelagem de desativação enzimática com um estágio (Equação 5) se ajustou bem aos resultados obtidos. Apresentaram nível de significância menor que 5% ($p < 0,05$) tornando-os significativo pelo teste t de *Student* pelo modelo de desativação com um estágio.

Tabela 3 - Ajustes dos dados experimentais aos modelos de inativação térmica de primeira ordem e em série em uma única etapa para β -galactosidase imobilizada e reticulada.

T (°C)	Equação	K_d (min ⁻¹)	Valor – p	Alpha (α_1)	Valor – p (alpha)	R ²
30	5	0,005128	0,036394	-	-	0,55
	6	0,0004	0,999603	-12,3443	0,999614	0,55
40	5	0,000585	0,029629	-	-	0,62
	6	0,00008	0,998133	-5,82010	0,998192	0,63
50	5	0,016146	0,000718	-	-	0,81
	6	0,062039	0,001847	0,420429	0,000032	0,99
55	5	0,091115	0,000021	-	-	0,98
	6	0,097154	0,001112	0,028581	0,584575	0,99
60	5	0,315708	0,000024	-	-	0,98
	6	0,351353	0,000122	0,039890	0,125293	0,99

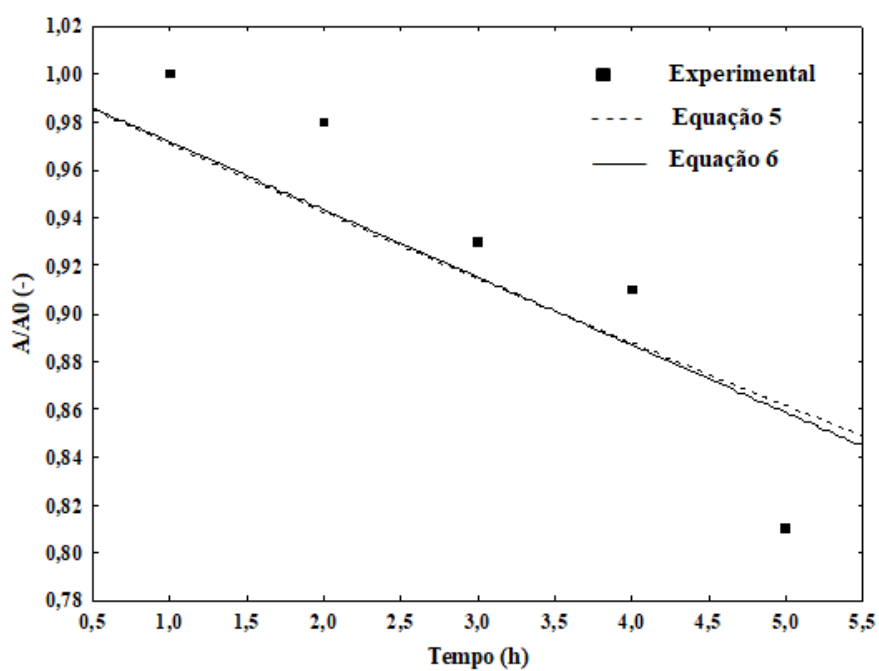
Vale ressaltar que analisar apenas o coeficiente de determinação não define a escolha do melhor modelo de desativação enzimática. Como pode ser observado, nas Tabelas 2 e 3, foi apresentado valores maiores de coeficientes de determinação, porém não foram significativos pelo teste t de *Student* a 5% ou valor negativo de α_1 .

Analisando a Figura 9 relacionada à temperatura de 30°C, verifica-se que não houve bom ajuste entre os valores experimentais e teóricos tanto para a enzima imobilizada sem ou com reticulação (Figura 9A e 9B, respectivamente). Os coeficientes de determinação foram baixos, sendo igual a 0,74 (Equação 5) e 0,80 (Equação 6) para a enzima imobilizada sem reticulação (Tabela 2) e, 0,55 (Equação 5 e 6) para enzima imobilizada reticulada (Tabela 3). A enzima imobilizada reticulada (Figura 9B) mostrou um período de estabilidade até 180 minutos com atividade inalterada, isso fez com que não houvesse um bom ajuste entre os valores. Em temperatura de 30°C, em 300 minutos a enzima imobilizada sem reticulação

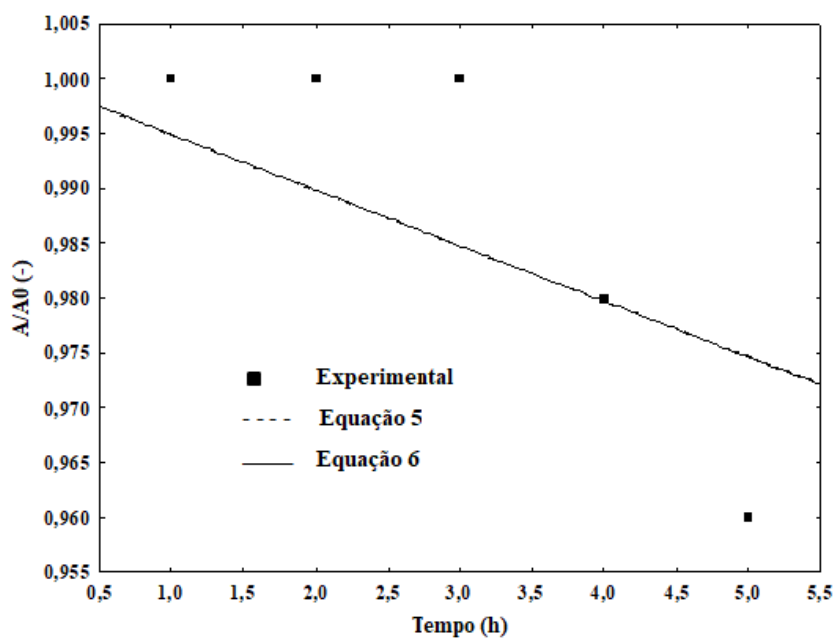
perdeu cerca de 20% da sua atividade inicial enquanto a enzima imobilizada reticulada perdeu apenas 4% da sua atividade inicial.

Figura 7: Perfil de inativação térmica a 30°C para β -galactosidase imobilizada não reticulada (A) e imobilizada reticulada (B) usando os dois modelos de inativação (Equação 5 e 6).

A - Enzima imobilizada não reticulada



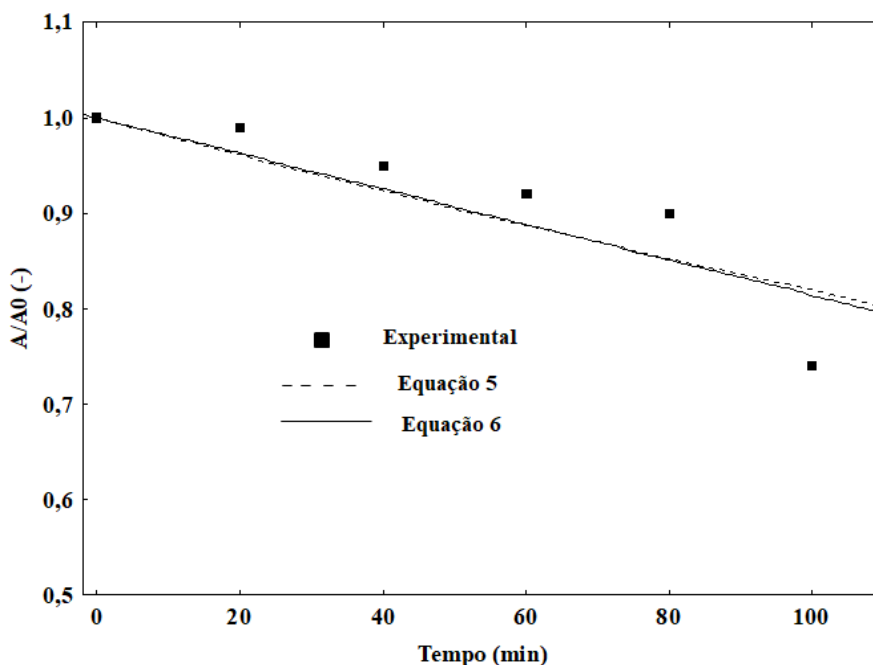
B - Enzima imobilizada reticulada

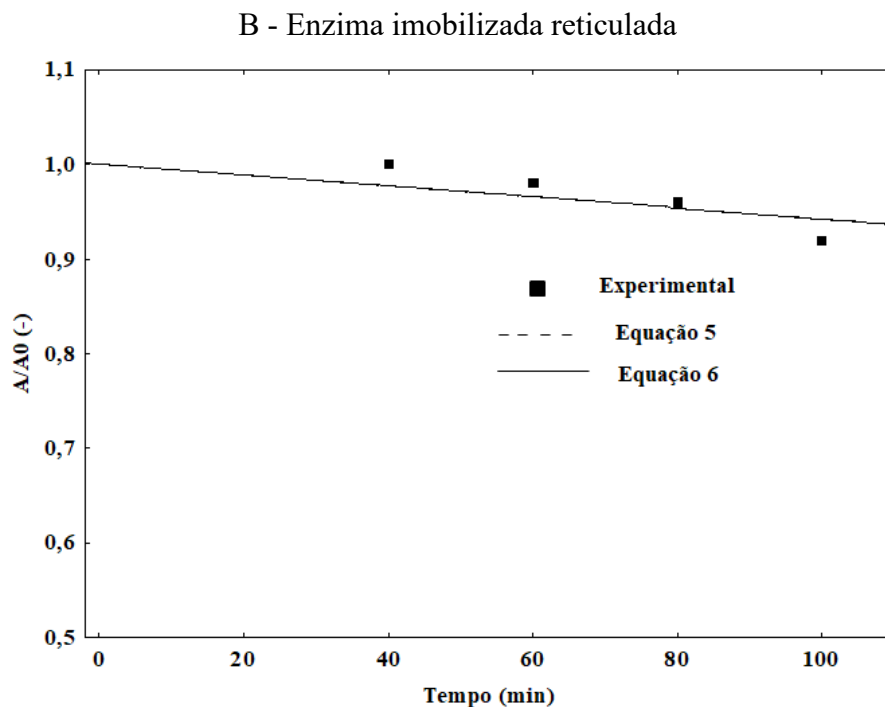


Em relação à temperatura de 40°C verifica-se que não apresentou um bom ajuste entre os valores experimentais e teóricos, tanto para a enzima imobilizada sem ou com reticulação (Figura 10A e 10B, respectivamente). Os coeficientes de determinações foram baixos, sendo igual a 0,70 (Equação 5) e 0,77 (Equação 6) para a enzima imobilizada sem reticulação (Tabela 2), 0,62 (Equação 5) e 0,63 (Equação 6) para enzima imobilizada reticulada. A temperatura de 40°C não inativou consideravelmente a enzima em 100 minutos de tempo experimental, retraindo mais de 70% da sua atividade. Para a enzima imobilizada reticulada (Figura 10B) a inativação ainda foi muito baixa, visto que foi observado um grande patamar de estabilidade que não foi previsto pelos modelos de inativação. Para isso foram considerados pontos a partir do decréscimo de atividade (Figura 10B) e como os dois modelos de desativação apresentaram quase o mesmo coeficiente de determinação (0,62 e 0,63) os gráficos ficaram sobrepostos. Com 100 minutos de incubação a 40°C a enzima imobilizada reteve 74% da sua atividade enquanto a enzima imobilizada reticulada reteve 92%.

Figura 8: Perfil de inativação térmica a 40°C para β -galactosidase imobilizada não reticulada (A) e imobilizada reticulada (B) usando os dois modelos de inativação (Equação 5 e 6).

A - Enzima imobilizada não reticulada

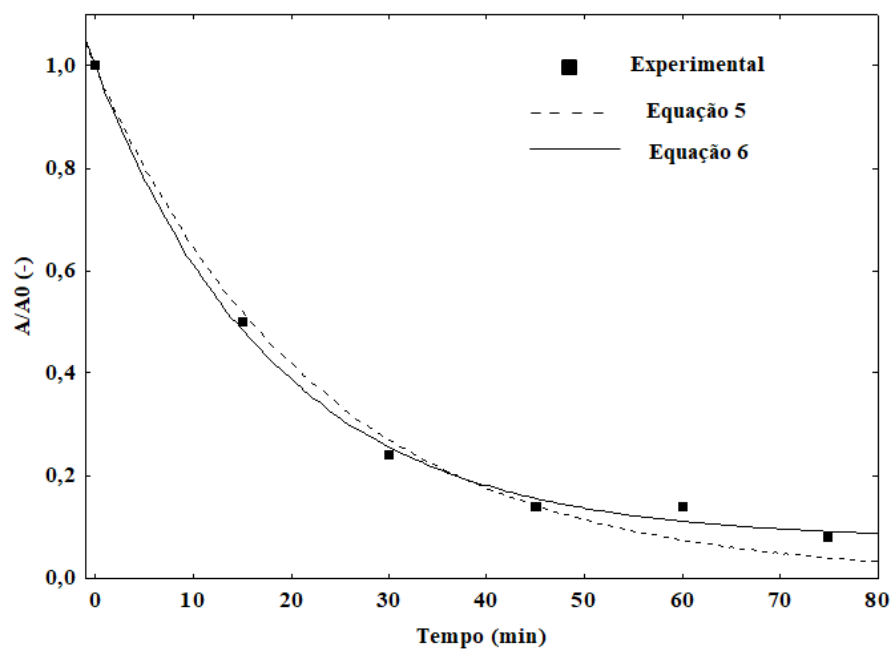




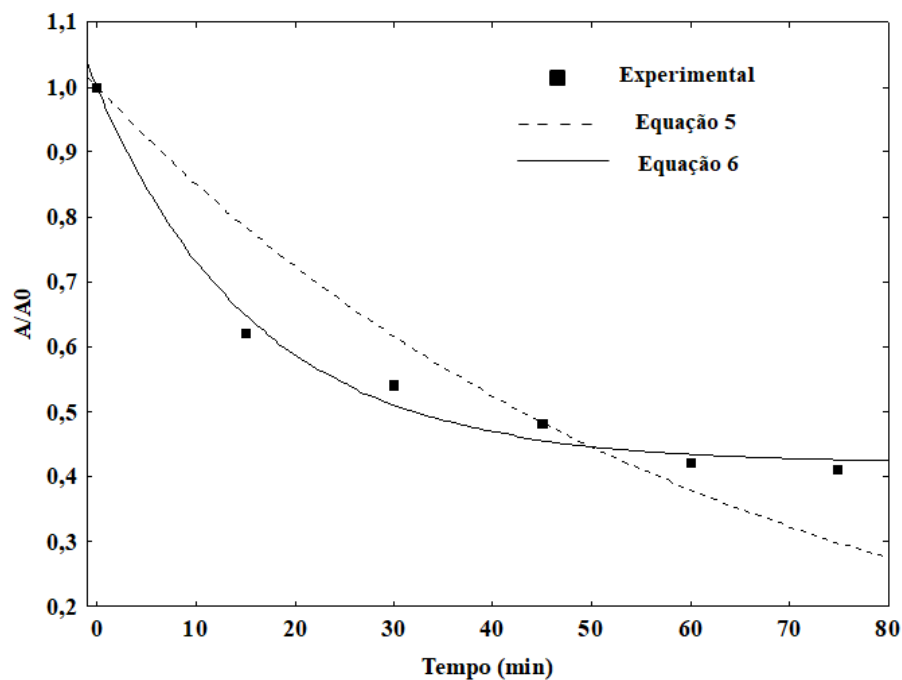
A partir dos dados apresentados nas Figuras 11A e 11B (temperatura 50°C) verifica-se um bom ajuste entre os valores experimentais e teóricos para a enzima imobilizada sem ou com reticulação. A enzima reticulada e não reticulada apresentaram excelentes coeficientes de determinação, sendo de 0,99 (Tabela 2 e 3) para o modelo de inativação em série em uma única etapa (Equação 6). Pelo Gráfico da Figura 11, a Equação 6 foi a que melhor se ajustou aos valores experimentais. A inativação térmica a 50°C foi maior para a enzima imobilizada não reticulada (Figura 11A) que perdeu 50% da atividade residual em apenas 15 minutos de incubação, enquanto a enzima imobilizada reticulada (Figura 11B) manteve 62% de atividade residual no mesmo tempo (15 min) de incubação. Foi observado que a imobilização seguida de reticulação promoveu uma resistência térmica ao biocatalisador.

Figura 9: Perfil de inativação térmica a 50°C para β -galactosidase imobilizada (A) e imobilizada reticulada (B) usando os dois modelos de inativação (Equação 5 e 6).

A - Enzima imobilizada não reticulada



B - Enzima imobilizada reticulada

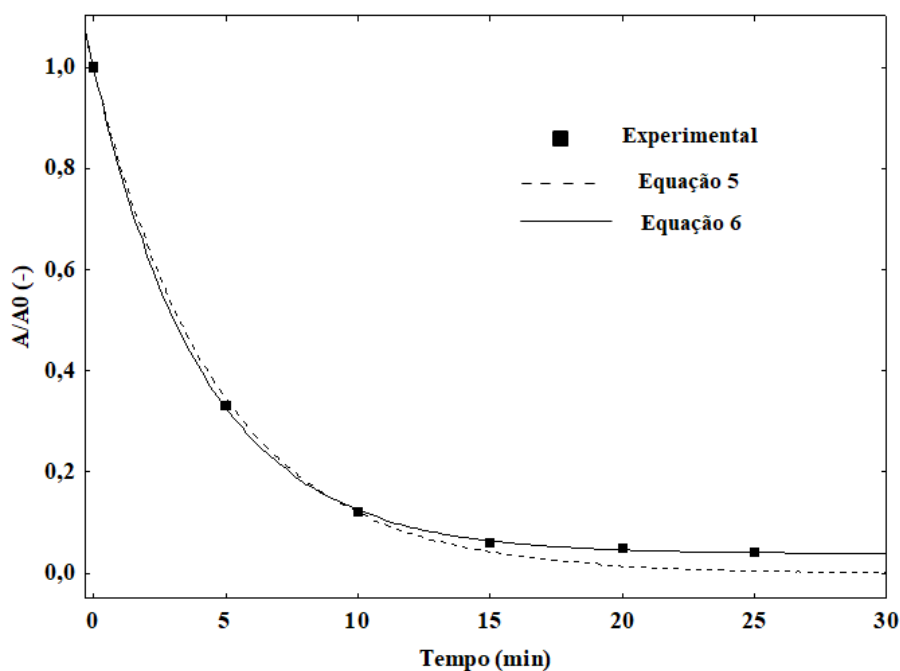


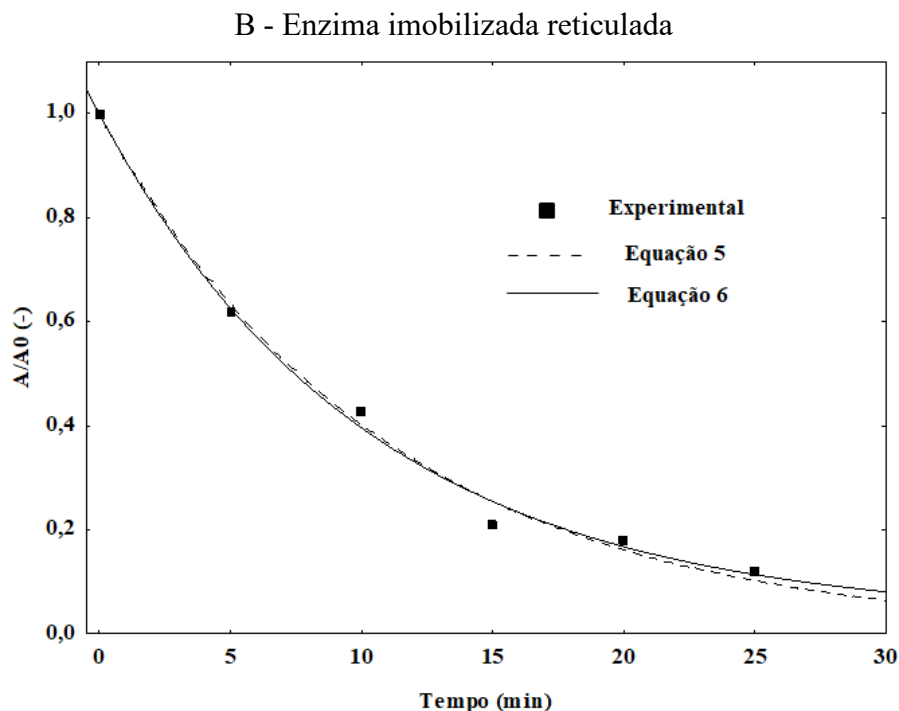
Analisando os dados apresentados na Figura 12 (A e B) verifica-se um bom ajuste entre os valores experimentais e teóricos da atividade residual para a enzima imobilizada sem ou com reticulação. A enzima imobilizada sem reticulação (Gráfico 12 e Tabela 2) apresentou

coeficientes de determinação de 0,95 e 0,99 (Equação 5 e 6 respectivamente). Como pode ser observada na Figura 12B e Tabela 3, a enzima imobilizada reticulada apresentou melhor ajuste com valores teóricos, coeficientes de determinação de 0,98 e 0,99 (Equação 5 e 6 respectivamente). Para a temperatura de 55°C os dois modelos de inativação (Equação 5 e 6) se ajustaram aos valores experimentais. A inativação térmica a 55°C (Fig.12) foi maior do que a inativação a 40°C e 50°C, sendo um resultado já esperado, pois quanto maior for a temperatura maior será a inativação. Entre a enzima imobilizada e imobilizada reticulada, a inativação foi alta para a enzima imobilizada sem reticulação, por exemplo, a 5 minutos de incubação a 55°C reteve apenas 33% de atividade residual enquanto a enzima reticulada nas mesmas condições reteve quase o dobro (62%). Observando os dados da Figura 12, a reticulação promoveu uma maior resistência térmica à enzima imobilizada.

Figura 10: Perfil de inativação térmica a 55°C para β -galactosidase imobilizada (A) e imobilizada reticulada (B) usando os dois modelos de inativação (Equação 5 e 6).

A - Enzima imobilizada não reticulada

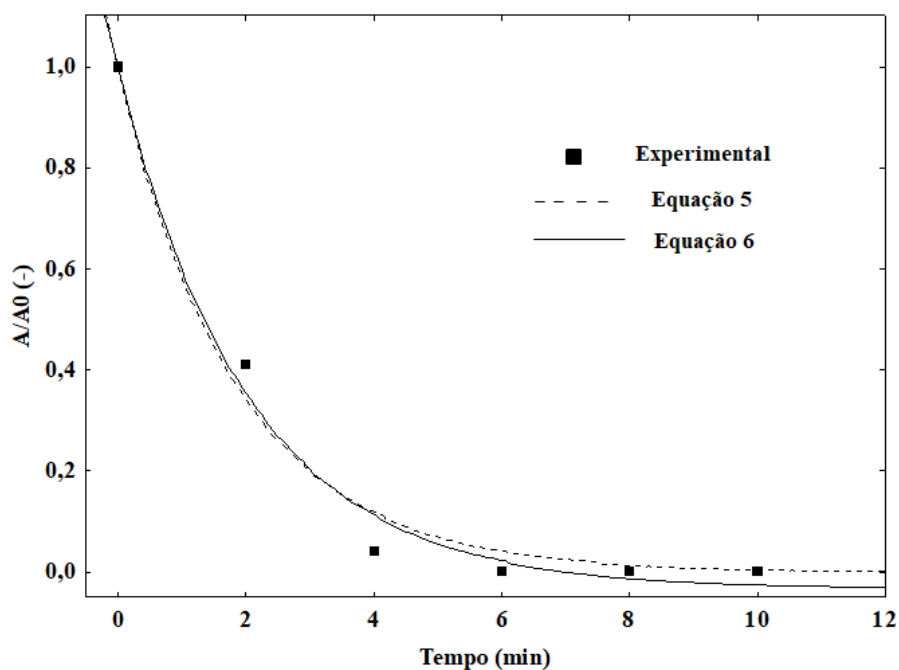




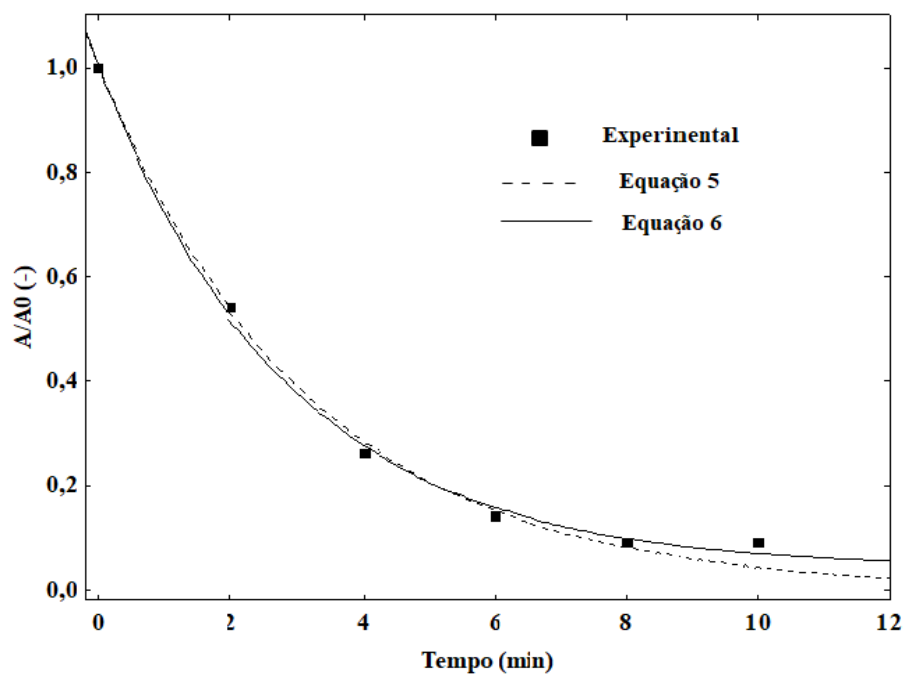
Alisando a Figura 13 (A e B), temperatura 60°C, verifica-se um bom ajuste entre os valores experimentais e teóricos da atividade residual para a enzima imobilizada sem ou com reticulação nos dois modelos de desativação (Equação 6 e 5). A enzima imobilizada sem reticulação, como pode ser visto na Tabela 2 apresentou bons coeficientes de determinação de 0,91 e 0,99 (Equação 5 e 6, respectivamente). A enzima imobilizada reticulada apresentou melhor ajuste com valores teóricos, coeficientes de determinação de 0,98 e 0,99 (Equação 5 e 6 respectivamente) (Tabela 3). Quando maior o coeficiente de determinação, melhor é o ajuste entre os valores experimentais e teóricos. A inativação térmica a 60°C (Fig.13) foi maior do que a inativação a 40, 50 e 55°C, resultado esse já esperado, pois quanto maior a temperatura maior será a inativação. Entre a enzima imobilizada e imobilizada reticulada, a perda de atividade enzimática foi maior para a enzima imobilizada sem reticulação, por exemplo, em 2 minutos de incubação a 60°C apresentou 41% de atividade residual enquanto a enzima reticulada nas mesmas condições apresentou 54% de atividade residual. A reticulação com o glutaraldeído promoveu mais uma vez uma maior resistência térmica ao biocatalizador imobilizado.

Figura 11: Perfil de inativação térmica a 60°C para β -galactosidase imobilizada (A) e imobilizada reticulada (B) usando os dois modelos de inativação (Equação 5 e 6).

A - Enzima imobilizada não reticulada



B - Enzima imobilizada reticulada



Utilizando as constantes de inativação térmica (k_d) ajustadas aos modelos de desativação térmica, os tempos de meia vida foram determinados para cada temperatura. Os

tempos de meia-vida foram determinados considerando o melhor ajuste dos dados experimentais às Equações de inativação térmica (Equações 5 e 6) utilizando a Equação 7 e 8, para os modelos de inativação térmica de primeira ordem e em série com uma única etapa, respectivamente (Tabela 4). Observando a Tabela 4, para a temperatura de 30°C, os tempos de meia-vida para enzima imobilizada e imobilizada reticulada foram de 1.395,27 e 8.110,15 minutos, respectivamente. Para a temperatura de 40°C, para a enzima imobilizada e imobilizada reticulada foi de 347,97 e 1.204,87 minutos, respectivamente. Altos valores de tempos de meia-vida explicam que a temperatura de 30 e 40°C não afetaram substancialmente a enzima imobilizada nos tempos de incubação testados.

Quando a β -galactosidase de *Lactobacillus plantarum* HF571129 foi imobilizada em nanopartículas de óxido de zinco (ZnO NPs) usando a técnica de adsorção, o tempo de meia-vida foi de 130,78 min a 35°C (SELVARAJAN et al., 2015) sendo menor quando comparado aos tempos encontrados neste trabalho a 40°C. O tempo de meia-vida da β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* imobilizada em esteiras de nanofibra de gelatina eletrofiada e reticulada com hexametilenodiamina foi de 740 horas e a não reticulada foi 931 horas a 30°C em uma hora de incubação (SASS & JÖRDENING, 2020).

Tabela 4 - Valores de kd e tempos de meia-vida calculados pelo modelo de primeira ordem de desativação térmica da enzima imobilizada e imobilizada reticulada.

Temperatura (°C)	Equações	Kd (m ⁻¹)		R ²		t _{1/2} (min)	
		Sem reticulação	Com reticulação	Sem reticulação	Com reticulação	Sem reticulação	Com reticulação
30	5 - 7	0,029807	0,005128	0,55	0,55	1395,27	8110,15
40	5 - 7	0,001992	0,000585	0,70	0,62	347,97	1204,87
50	5 - 7	0,043557	0,016146	0,93	0,81	15,91	42,93
55	5 - 7	-	0,091115	-	0,98	-	7,61
55	6 - 8	0,240172	-	0,99		3,05	-
60	5 - 7	0,535909	0,315708	0,91	0,98	1,29	2,20

O tempo de meia-vida encontrado por Sass & Jördening (2020) foram maiores devido à baixa temperatura. Para temperatura de 50°C o tempo de meia-vida foi 15,91 minutos para a enzima imobilizada sem reticulação e 42,94 minutos para enzima imobilizada seguida de reticulação, notando-se uma diferença de cerca 63% nos tempos. A reticulação com glutaraldeído (2%) promoveu uma maior resistência térmica à enzima imobilizada. Tempos de meia-vida a 50°C foram extremamente pequenos, 28 vezes menor para enzima reticulada e

22 vezes menor para enzima não reticulada quando comparados aos de tempos de meia-vida observados à 40°C.

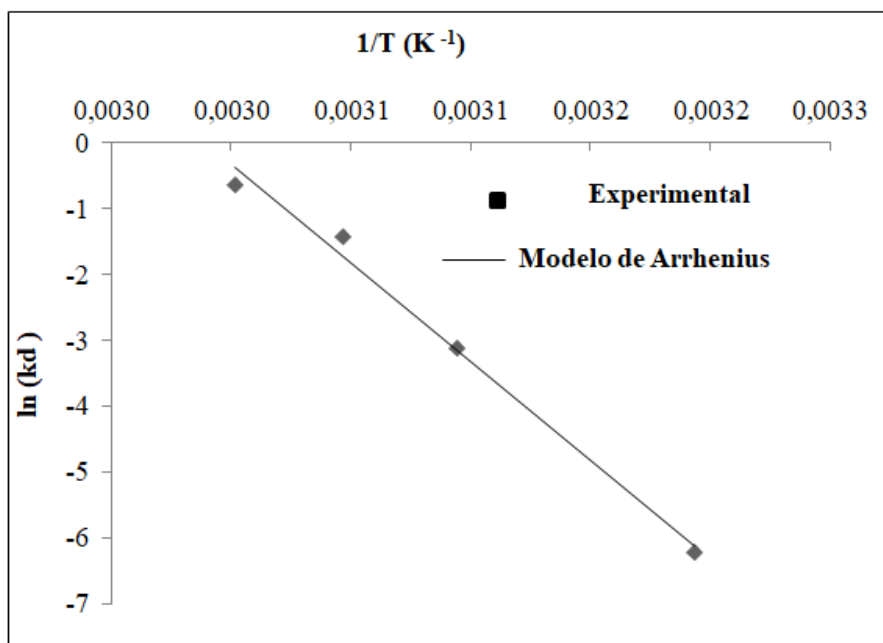
Quando empregada a temperatura de 55°C e 60°C os tempos de meia-vida caíram consideravelmente em relação às demais condições avaliadas. A enzima imobilizada sem reticulação reteve apenas 33% da sua atividade em 5 minutos a 55°C, tempo de meia vida 3,03 minutos, sendo 5 vezes menor do que obtido a 50°C. Para enzima imobilizada e reticulada o tempo de meia vida foi em 7,13 minutos a 55°C, mais que o dobro do tempo de meia-vida da enzima não reticulada. De acordo com Mirsalami e Alihosseini (2021), a cinética de desativação mostrou, que o tempo de meia-vida da β -galactosidase de *Aspergillus niger* imobilizada em monólitos cerâmicos a 55°C é de cerca de 17 dias. Essa maior resistência deve estar relacionada ao método de imobilização ou a fonte da β -galactosidase.

Observa-se a 60°C (Tabela 4) que a enzima reticulada apresentou maior resistência térmica, com 2,20 minutos de meia-vida enquanto a enzima não reticulada apresentou 1,29 minutos. A β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* imobilizada em partículas de quitosana, reticuladas com 5% de glutaraldeído, apresentou um tempo de meia-vida de 0,47 horas a 60°C, enquanto aquela imobilizada em partículas de quitosana reticuladas e ativadas com 4,8 g/L epícloridrina apresentou 0,75 horas de meia-vida, na mesma temperatura (URRUTIA et al., 2018). Relacionando os resultados deste trabalho e dos autores o método de imobilização e fonte da enzima tem uma grande influência na resistência da β -galactosidase. Nguyen et al., (2019) observaram que o tempo de meia-vida da β -galactosidase de *Aspergillus aculeatus* imobilizada covalentemente em nanopartículas magnéticas revestidas de quitosana ativadas com glutaraldeído melhorou significativamente após a imobilização de 2,5 dias para mais de 6 dias a 60°C.

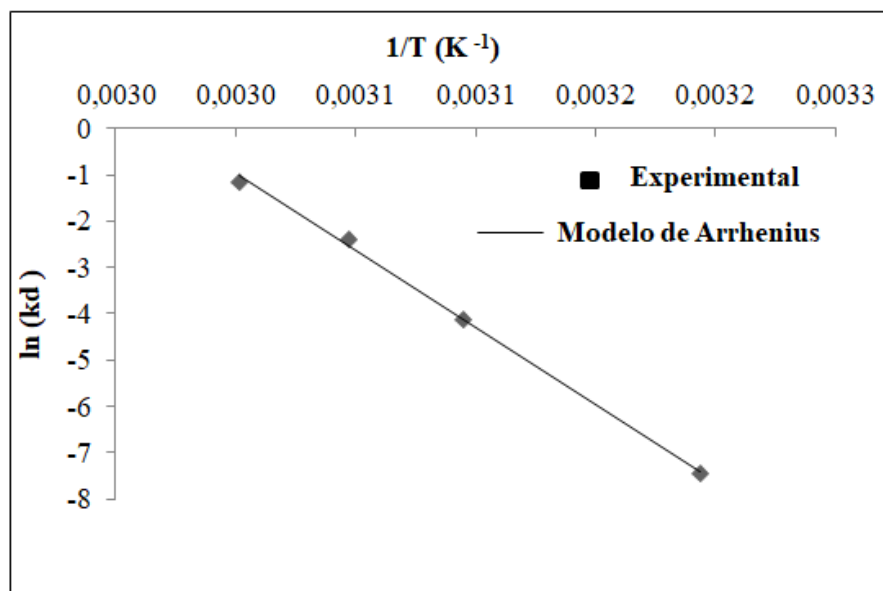
Para determinar a energia de ativação do processo de desativação térmica, os resultados de (kd) em função da temperatura (Tabela 4) foram ajustados ao modelo de Arrhenius (Equação 9) utilizando Microsoft Excel 2010. Com o ajuste obteve-se a Figura 13, sendo na Figura 13A apresentado o ajuste da enzima imobilizada não reticulada e na Figura 13B para a enzima imobilizada reticulada.

Figura 12. Ajuste do modelo de Arrhenius aos dados experimentais (valores de k_d).

A - Enzima imobilizada não reticulada



B - Enzima imobilizada reticulada



O ajuste linear ao modelo de Arrhenius apresentou uma linearidade aos valores experimentais, resultando em um coeficiente de determinação de 0,99 tanto para a enzima imobilizada sem reticulação (Figura 13A) quanto para enzima imobilizada e reticulada (Figura 13B). Os valores de energia de ativação encontrados para a enzima imobilizada sem reticulação e da enzima imobilizada seguida de reticulação foram de 59.715,31 e 66.063,78

kcal/mol, respectivamente. Os valores foram proximamente iguais. Os resultados mostraram que a reticulação com glutaraldeído (2%) da β -galactosidase, de *Bacillus licheniformis*, imobilizada em resina Duolite A-568, tampão BR de pH 4 e condição de hidrólise de pH 6,5 e concentração de substrato 50g/L não afetou a energia de ativação do processo de desativação térmica da enzima. Estes valores da energia de ativação da reação indica que é necessário um grande aumento na temperatura do meio reacional para aumento a velocidade da reação.

A energia de ativação do processo de inativação térmica de β -galactosidase de *Enterobacter aerogenes* KCTC2190, imobilizada pelo método de aprisionamento em matriz de gel de ágar-ágar, foi 34,54 kJ/mol (MAITY, BHATTACHARYYA & BHOWAL, 2021) sendo um valor muito menor ao encontrado no presente trabalho, isso mostra que a β -galactosidase de *Enterobacter aerogenes* imobilizada é menos sensível que a β -galactosidase de *Bacillus licheniformis* imobilizada. A energia de ativação da inativação térmica da β -Galactosidase de *Lactobacillus plantarum* HF571129 imobilizada sobre nanopartículas de óxido de zinco (ZnO NPs) usando a técnica de adsorção e reticulação foi de 24,33 kcal/mol (SELVARAJAN et al., 2015). Também os autores encontraram valor de energia de ativação de desativação térmica baixo, uma enzima menos sensível que a enzima utilizada neste trabalho. Lima et al., (2013) também encontraram baixos valores de energia de ativação de desativação térmica sendo 283,09; 283,01 e 282,92 kJ/mol para β -galactosidase de *Kluyveromyces* imobilizada em quitosana a 40, 50 e 60°C, respectivamente.

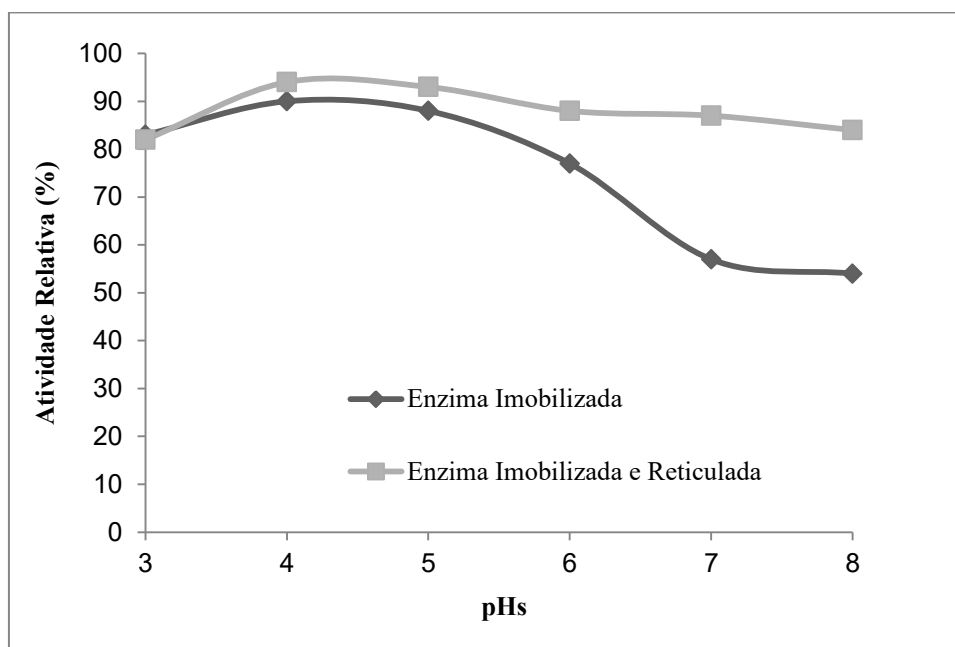
4.4 Estabilidade ao pH da enzima imobilizada e imobilizada reticulada

Foi estudada a estabilidade da β -galactosidase de *Bacillus licheniformis* imobilizada e imobilizada reticulada em relação ao pH. O efeito do pH (3 a 8) em tampão BR de 40 mM, temperatura ambiente do biocatalisador está apresentado na Figura 6. Para os dois protocolos de imobilização, variando do pH 3 para o 4, a retenção da atividade teve um incremento, passando de 83 a 90% para a enzima apenas imobilizada e de 82 a 94% para a enzima imobilizada reticulada. Em valor de pH superior 4 observa-se uma queda na atividade enzimática.

A retenção da atividade inicial apresentou uma diminuição com o aumento do pH, sendo o biocatalisador obtido apenas por imobilização (sem reticulação) mais sensível a estas condições, com redução da atividade inicial na ordem de cerca de 50% em pH 3 e 8. A estabilidade da enzima reticulada foi maior mantendo sua atividade acima de 70% em todos os valores de pH, ao contrário da enzima imobilizada sem reticulação. Os dois biocatalisadores apresentaram atividade máxima 90% (enzima imobilizada) e 94% (enzima imobilizada reticulada) em pH 4 considerado como melhor pH de estocagem para essa enzima

em temperatura ambiente (25°C). O pH 4, valor ótimo em tampão BR, 40 mM, para estocagem de β -galactosidase imobilizada de *Bacillus licheniformis*.

Figura 13: Estabilidade da enzima imobilizada e imobilizada reticulada em diferentes valores de pH em tampão BR, 40 mM, depois de 24h a 25°C.



Vale ressaltar que o melhor pH de estabilidade em relação à estocagem de uma enzima pode ser diferente do seu pH ótimo de atividade. De acordo com Kessi e Árias (2019) o melhor pH de estabilidade em tampão de fosfato de sódio de 40 mM, da β -galactosidase de *E. coli* (EC 3.2.1.23) livre, foi de cerca de 7,0, um valor ligeiramente superior ao valor observado de 6,8 para a enzima imobilizada em pó da membrana da casca do ovo e reticulada com 0,2% de glutaraldeído. Sass & Jordening (2020) avaliaram o efeito do pH na atividade da β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* em tampão citrato fosfato de 0,02 M. A enzima livre apresentou uma ampla faixa de pH (2,5 a 5,5) onde mudanças significativas na atividade relativa não foram observadas, enquanto a faixa ótima de pH 2,5 a 6,5 foi observada para a β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* imobilizada e reticulada com hexametilenodiamina. A atividade máxima da β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* livre e imobilizada foi encontrada em pH 5,2 sendo maior para a enzima imobilizada em esferas de vidro modificadas com 3-aminopropil trietoxissilano (ESKANDARLOO e ABBASPOURRAD, 2018). O trabalho de Falleiros et al. (2017) mostrou que o melhor pH de estabilidade da β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* imobilizada em Duolite A-568 foi de pH 5.

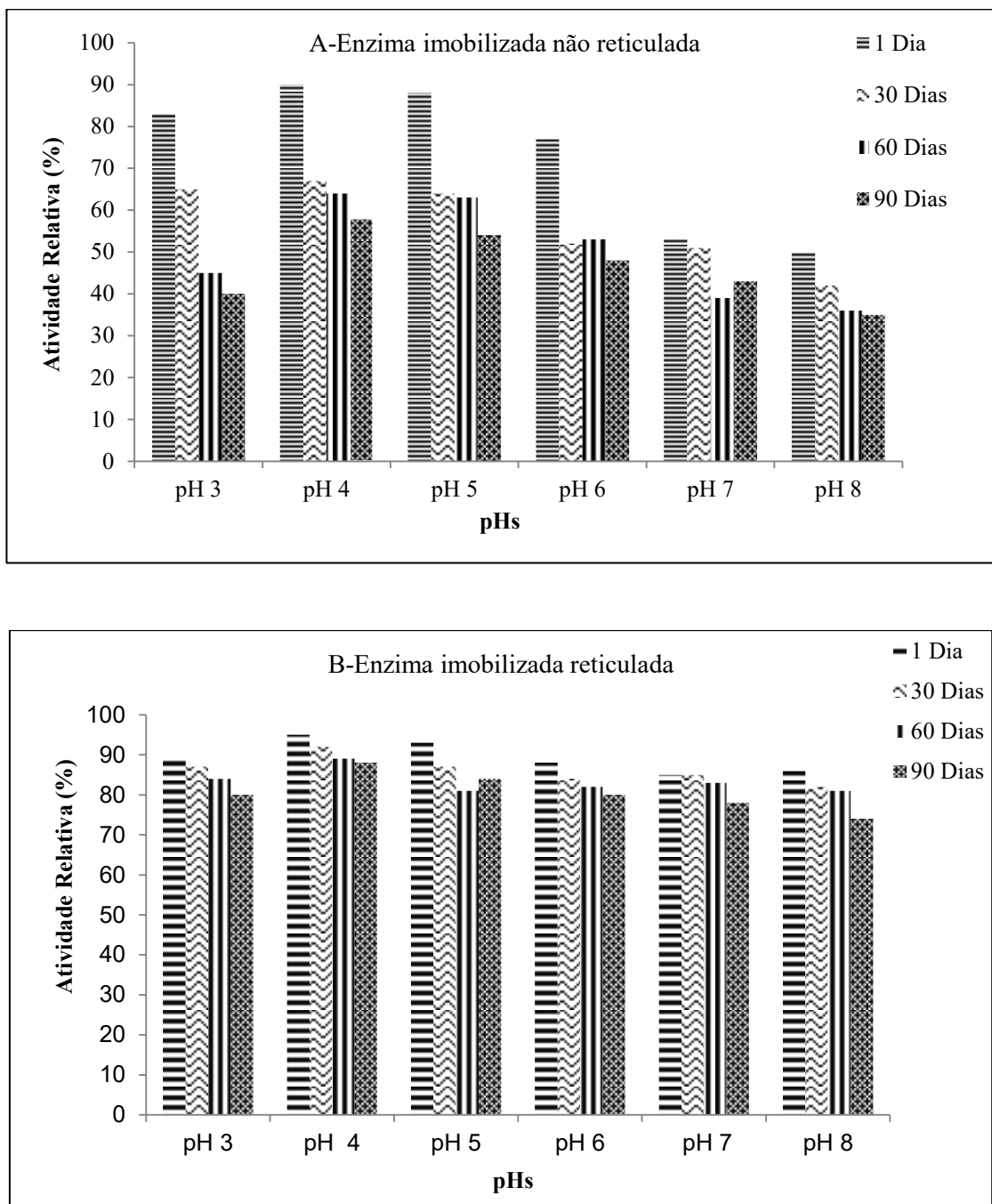
4.5 Estabilidade ao armazenamento da enzima imobilizada e imobilizada reticulada

A perda de atividade enzimática é um aspecto importante a ser estudado e compreendido para sua viabilidade industrial. Muitos estudos mostraram que a estabilidade enzimática da β -galactosidase livre e imobilizada diminui durante o armazenamento (SHAFI, AHMED e HUSAIN, 2021). O grau de perda de atividade da β -galactosidase imobilizada durante o armazenamento depende de vários fatores como pH, fonte microbiológica, temperatura, tempo de armazenamento e tratamento pós imobilização como a reticulação entre outros (YADAV et al. 2019),

A estabilidade ao armazenamento da β -galactosidase de *Bacillus licheniformis* imobilizada e imobilizada reticulada em diferentes valores de pH (3 a 8) em tampão BR, 40 mM, durante 90 dias de incubação, a 4°C, pode ser observada na Figura 6. Durante o armazenamento, a β -galactosidase imobilizada e imobilizada reticulada perderam atividade de forma diferenciada. A enzima apenas imobilizada (Figura 7A) apresentou maior perda durante todo o tempo de estocagem. A maior atividade residual da enzima não reticulada observada nos 90 dias foi 58% (pH 4) seguido de 54% (pH 5) sendo mais estável em pH levemente ácido. Em contrapartida a enzima reticulada (Figura 7B) manteve sua atividade maior ou igual a 80% durante os 90 dias em todos os valores de pH testados.

A β -galactosidase imobilizada e armazenada a 4°C em tampão de acetato de sódio 0,1 M (pH 4,5) reteve cerca de 85% de sua atividade após 60 dias (SHAFI, AHMED e HUSAIN, 2021), apresentando um bom resultado. Relacionando com o resultado do presente estudo, em pH 4, após 60 dias a enzima não reticulada reteve 64% de atividade, a diferença pode estar no tipo do tampão utilizado, mas a enzima reticulada reteve 89% de atividade residual. O estudo de Yadav et al. (2019) mostraram uma excelente estabilidade da β -galactosidase de *Lens culinaris* imobilizada em nanotubos de carbono de paredes múltiplas. Em 8 meses de armazenamento, em condições secas e úmidas, (tampão de acetato de sódio, 50 mM, pH 5,5) à temperatura ambiente e 4°C, respectivamente, a enzima imobilizada reteve 92% da atividade residual sob condições úmidas e 84% em condições secas.

Figura 14: Estabilidade da enzima imobilizada (A) e imobilizada reticulada (B) em diferentes valores de pH em tampão BR, 40 mM, durante 90 a 4°C.



O biocatalisador, obtido por imobilização e reticulação (Figura 7B), apresentou melhor resultado de estabilidade ao armazenamento em diferentes valões de pH (3 a 8) em tampão BR de 40 mM, durante 90 dias de incubação a 4°C, quando comparados com a enzima imobilizada sem reticulação (Figura 7A). Em todos os valores de pH e tempo de armazenamento, a enzima imobilizada reticulada manteve sua atividade residual acima de 70%. A reticulação enzimática com glutaraldeído aumenta a estabilidade enzimática pela

formação de agregados de enzimas, devido à ligação cruzada, protegendo os sítios ativos desses biocatalisadores, assim melhorando sua estabilidade operacional (BINHAYEEDING et al., 2020).

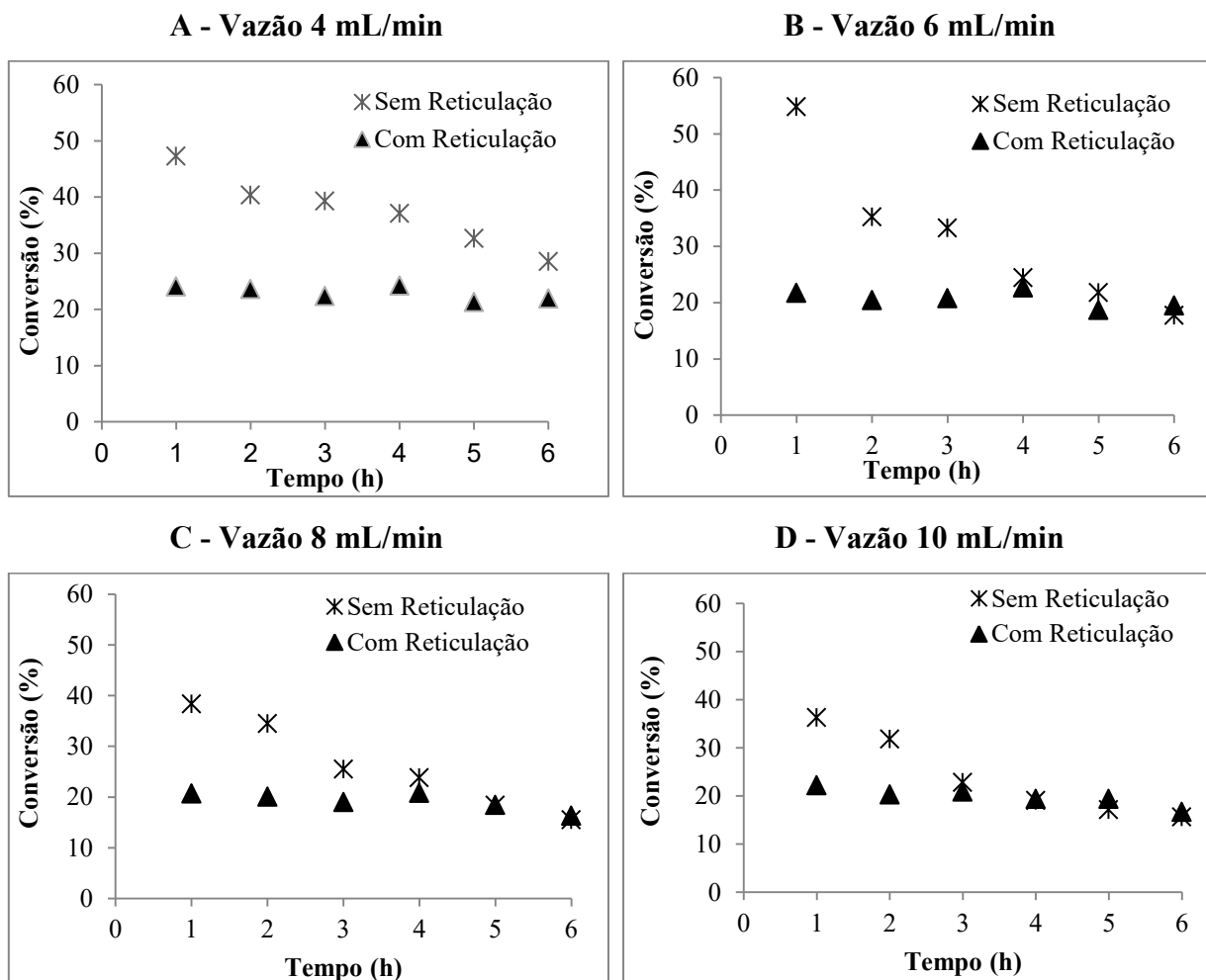
A β -galactosidase de *Lactobacillus leichmannii* 313 imobilizada pela tecnologia de agregados enzimáticos reticulados com glutaraldeído (25% p/v), mantidos em tampão fosfato de sódio (50 mM, pH 7,0) a 4°C, durante 14 dias, mostraram uma boa estabilidade. Os resultados mostraram uma retenção de até 90% de sua atividade inicial no décimo quarto dia da enzima imobilizada por reticulação, principalmente naquela precipitada em sulfato de amônio saturado (XU et al., 2020). Os resultados deste trabalho corroboram com o resultado de Xu et al. (2020) e, também, com os resultados de Guidini et al. (2010) onde foi observado que a enzima imobilizada sem reticulação reteve 51% de sua atividade inicial após 30 usos consecutivos, em 30 dias, enquanto o valor da atividade residual da enzima imobilizada seguida da reticulação com glutaraldeído (3,83 g/L) foi de 90% da atividade inicial. A reticulação mostrou mais uma vez sua capacidade estabilizante de enzimas.

Outras pesquisas também mostraram a eficiência do glutaraldeído como agente reticulante, melhorou a estabilidade de diversas enzimas, além da β -galactosidase. A enzima α -amilase de origem fúngica reticulada com glutaraldeído manteve sua atividade após dois meses, enquanto a enzima solúvel perdeu sua atividade completamente após 10 e 20 dias de armazenamento, a 30°C e 4°C, respectivamente (ULLAH et al., 2021). A lipase de *Candida* imobilizada em partículas de polihidroxibutirato e reticulada com glutaraldeído (1%) apresentou uma maior estabilidade ao armazenamento em relação à enzima livre. A lipase imobilizada e reticulada reteve 80% de atividade após o armazenamento por 30 dias, em tampão fosfato de sódio 0,2 M (pH 7) a 4°C, enquanto a enzima livre teve uma perda total da sua atividade em 20 dias. A reticulação enzimática tanto para imobilização, quanto para estabilização impacta positivamente na estabilidade da enzima (BINHAYEEDING et al., 2020).

4.6 Estabilidade enzimática na conversão da lactose do permeado de soro de leite em reator contínuo

Os resultados do estudo da estabilidade enzimática na conversão da lactose de permeado de soro de leite, por enzima imobilizada e imobilizada reticulada, durante 6 horas, em reator contínuo com diferente vazão de alimentação são apresentados na Figura 15. Os resultados mostraram que a capacidade inicial de conversão de lactose por enzima apenas imobilizada é maior que da enzima imobilizada reticulada em todas as vazões de alimentação avaliadas.

Figura 15: Estudo da estabilidade da atividade enzimática na conversão global da lactose em reator de leite fixo em regime contínuo com diferente vazão de alimentação A (4 mL/min), B (6 mL/min), C (8 mL/min) e D (4 mL/min).



Observando todos os gráficos (Figura 15) com diferentes vazões de alimentação, apesar da baixa conversão global, a enzima imobilizada seguida de reticulação foi mais estável durante todos os tempos de reação. Por exemplo, na Figura 15A, vazão de 4 mL/min, em 6 horas de reação, a enzima imobilizada reticulada manteve cerca de 92% da sua capacidade inicial de conversão enquanto a não reticulada manteve 60%. Na Figura 15B, com vazão de 6 mL/min, em 5 horas de reação a capacidade de conversão de lactose pela enzima imobilizada reticulada foi de cerca de 86% e 40% para enzima apenas imobilizada. Já para a Figura 15C, com vazão de 8 mL/min, em 3 horas de reação, a enzima imobilizada sem reticulação perdeu 34% da sua capacidade inicial de conversão e para enzima reticulada a perda foi de cerca de 10%. Em 6 horas de reação, com vazão de alimentação 10 mL/min (Figura 15D), a enzima apenas imobilizada perdeu mais de 50% da sua capacidade inicial de conversão enquanto a perda foi menor para enzima imobilizada reticulada. A enzima

imobilizada reticulada foi mais estável na conversão de lactose do que a enzima imobilizada sem reticulação. A alta estabilidade da β -galactosidase imobilizada pelo método de reticulação com glutaraldeído foi também observada no trabalho de Klein et al. (2016). O efeito positivo da reticulação com glutaraldeído na imobilização enzimática em sua estabilidade foi relatado por Zaak et al. (2017), observando que a ligação covalente multipontual com o suporte aumentou a estabilidade do biocatalisador.

Os resultados da influência da vazão na conversão global da lactose são apresentados na Tabela 5. Os resultados apresentados mostraram que a conversão da lactose diminuiu com o aumento da vazão, sendo esse resultado já esperado, visto que a diminuição da vazão implica em maior tempo de residência do meio reacional no interior do reator. Quanto maior for o tempo de contato do substrato com a enzima maior será a reação de conversão. Para a enzima imobilizada não reticulada, o aumento da vazão de 4 para 8 e 10 mL/min resultou em uma diminuição na capacidade inicial de conversão de lactose de 18,80 e 23,08%, respectivamente. Para a enzima imobilizada reticulada também foi observado que o aumento da vazão de 4 mL/min para 6, 8 e 10 mL/min resultou uma diminuição na conversão de lactose de 9,74; 14,02 e 23,34%, respectivamente. A diferença do grau de conversão entre as vazões 4, 6, 8 e 10 mL/min está relacionada à tempo de residência do substrato no reator: 3,75; 2,5; 1,88 e 1,5 min respectivamente. No presente trabalho a vazão com melhor conversão de lactose foi de 4 mL/min para enzima imobilizada reticulada e 6 mL/min para enzima penas imobilizada.

Tabela 5 - Influência da vazão na conversão da lactose em reator contínuo.

Vazão (mL/min)	Sem Reticulação (%)	Com Reticulação (%)
4	47,22	24,03
6	54,78	21,69
8	38,34	20,66
10	36,32	18,42

A vazão em sistemas contínuos tem uma influência na conversão de lactose. Um aumento de dez vezes na taxa de fluxo reduz o rendimento de galactooligossacarídeos em fator 3,5 para 1 mL/min e 8 mL/min e em fator 2,7 para 80 mL/min (POTTRATZ, MULLER & HAMEL, 2022). Vasileva et al. (2016) imobilizaram a β -galactosidase covalentemente em uma membrana de polipropileno modificada com glutaraldeído. Os autores avaliaram a influência da vazão (0,5; 1,0 e 1,5 mL/min) na conversão da lactose durante 10 horas e observaram que o aumento da vazão de 0,5 para 1,5 mL/min diminuiu o grau de conversão da

lactose de cerca de 5% em 6 horas de atividade. No trabalho de Misson et al. (2020), estes pesquisadores estudaram a conversão da lactose por β -galactosidase imobilizada em nanofibras de poliestireno eletrofiadas quimicamente modificadas. Os autores avaliaram 5 diferentes vazões (2, 4, 6, 8 e 10 mL/min) de alimentação e observaram a medida que a taxa de alimentação aumentou (até 6 mL/min) aumentou também a taxa de conversão. A partir de 6 mL/min à medida que a taxa de alimentação aumentou foi observado um decréscimo na taxa de conversão. No estudo de Misson et al. (2020) a melhor vazão foi 6 mL/min.

4.7 Conversão da lactose em reator batelada com recirculação do substrato

Na Tabela 6, são apresentadas as conversões alcançada para cada biocatalisador (com e sem reticulação) em função do tempo de hidrólise em reator de leite fixo, em regime contínuo com recirculação do substrato permeado de soro de leite (50 g/L), vazão 4 mL/min. Observa-se que com o aumento do tempo da reação, aumenta o grau de conversão da lactose no reator, resultados que corroboram com os resultados de Vasileva et al. (2016).

Tabela 6 - Conversão da lactose em reator batelada (vazão 4 mL/min) com recirculação do substrato.

Tempo (h)	Com reticulação (%)	Sem reticulação (%)
1	17,88	24,80
2	21,34	45,23
3	24,79	52,69
4	27,87	82,63
5	31,82	85,45
6	34,90	89,57
7	39,84	91,11
8	42,18	92,14
9	46,87	100,00
10	51,31	100,00
24	99,90	100,00
25	100,00	100,00

Analisando os resultados observou-se que a conversão da lactose pela enzima apenas imobilizada é maior do que pela enzima imobilizada reticulada. Em uma hora de reação a enzima imobilizada sem reticulação converteu 24,80% e em 3 horas mais de 50% da lactose do meio reacional, enquanto a enzima imobilizada reticulada converteu apenas 17,88% em 1

hora e 10 horas para converter cerca de 50% da lactose. Em 9 horas de reação a enzima imobilizada não reticulada converteu 100% da lactose do meio reacional, enquanto que para enzima imobilizada reticulada a conversão completa da lactose do meio reacional só foi alcançada em 25 horas. A β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* imobilizada em nanopartículas de óxido de zinco modificadas com glutaraldeído, em 10 horas de reação à 50°C e 60°C converteu respectivamente 81% e 70% de lactose em reator descontínuo (ANSARI & DAMANHORY, 2023). No trabalho de Vasileva et al. (2016) observou-se que em 10 horas de reação, com vazão de 1 mL/min, o grau de conversão de lactose pela β -galactosidase imobilizada atingiu 91%. A diferença do grau de conversão entre a vazão 4 mL/min (tempo de residência 3,75 min) deste trabalho e da vazão 1 mL/min (tempo de residência 250 min) dos autores anteriormente citados, explica-se na diferença entre os tempos de residências, pois quanto menor for o tempo de residência do substrato no reator maior será a taxa de conversão.

O processo de reticulação com glutaraldeído (2 g/L) em β -galactosidase imobilizada foi biotecnologicamente viável para aumentar a estabilidade enzimática. Os resultados deste estudo mostraram as condições ótimas de temperatura (30°C a 40°C) e de pH (3 A 6) em que a perda de atividade da β -galactosidase imobilizada é minimizada durante o processo e o armazenamento. As condições de otimização do processo de conversão da lactose em reator de leite fixo em regime contínuo com aumento da produtividade. Em indústrias de laticínios as condições e qualidade do processo de hidrólise ou de conversão da lactose podem ser melhoradas com base dos resultados do presente estudo.

5 CONCLUSÃO

- A imobilização por adsorção iônica da enzima β -galactosidase de *Bacillus licheniformis* em resina de troca iônica Duolite A-568 em temperatura ambiente (aproximadamente 25°C), tampão BR com força iônica de 40 mM, pH 4,0 e concentração enzimáticas 43 mL/L mostrou boa eficiência (99%) do processo e bom rendimento (84%).
- O glutaraldeído pode ser utilizado como agente reticulante para a enzima β -galactosidase de *Bacillus licheniformis* e as melhores concentrações observadas para a reticulação foi de 2,0g/L e 2,5g/L, aumentando a estabilidade da enzima imobilizada.
- A reticulação da β -galactosidase, apesar de aumentar a estabilidade operacional, foi observada a diminuição da sua atividade catalítica de 756 a 326 $\mu\text{mol/min}$.
- A enzima β -galactosidase de *Bacillus licheniformis* imobilizada reticulada apresentou melhor estabilidade térmica, melhor estabilidade ao pH, melhor estabilidade a reutilização e ao armazenamento, quando comparada à enzima imobilizada sem reticulação.
- A estabilidade quando avaliada em relação ao pH para β -galactosidase de *Bacillus licheniformis* imobilizada foi de 4 que pode ser estendido de 4 até 6 se a imobilização for seguida de reticulação.
- A faixa de pH de estabilidade em tampão BR com força iônica de 40 mM em relação ao armazenamento da β -galactosidase de *Bacillus licheniformis* imobilizada foi de 5 a 7, com retenção de atividade média de cerca de 50% em 90 dias a 4°C. A enzima imobilizada reticulada comprovou estabilidade quanto ao armazenamento em pH de 3 a 8, em tampão BR com força iônica de 40 mM a 4°C, com retenção de atividade média de cerca 90% em 90 dias.
- As temperaturas operacionais com maior estabilidade da β -galactosidase de *Bacillus licheniformis* imobilizada foram de 30 a 40°C, retendo mais de 90% da sua atividade por mais tempo, apesar da reticulação poder aumentar a estabilidade térmica em temperaturas acima de 40°C.
- Os dados experimentais se ajustaram bem ao modelo de Arrhenius resultando em um coeficiente de determinação de 0,99 e energia de ativação encontrada

para a enzima imobilizada sem reticulação e da enzima imobilizada seguida de reticulação de 59.715,32 e 66.063,78 kcal/mol respectivamente.

- A enzima imobilizada não reticulada apresentou maior capacidade de conversão de lactose, porém, apesar, da baixa atividade de conversão de lactose pela enzima imobilizada reticulada ela demonstrou maior estabilidade.
- À medida que a vazão de alimentação aumentou, a conversão da lactose diminui devido à diminuição do tempo da residência.
- A β -galactosidase de *Bacillus licheniformis* imobilizada pode ser utilizada em reator contínuo aumentando assim a produtividade do processo de conversão.
- Em geral a imobilização enzimática é um processo viável de recuperação e reutilização do biocatalisador. Além da imobilização, a reticulação com glutaraldeído pode aumentar a estabilidade da enzima imobilizada em relação à temperatura, pH e armazenamento.
- Os resultados do estudo mostraram como a estabilidade da β -galactosidase de *Bacillus licheniformis* imobilizada pode ser melhorada para seu uso em laticínios e em biotecnologia. A recuperação da enzima e seu reaproveitamento para diminuição dos custos de produção.

6 SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS

- Estudar a estabilidade da β -galactosidase de *Bacillus licheniformis* imobilizada reticulada com outro agente reticulante diferente do glutaraldeído.
- Estudar a atividade da β -galactosidase de *Bacillus licheniformis* imobilizada usando o leite como substrato.
- Estudar a produção de oligossacarídeos por β -galactosidase de *Bacillus licheniformis* imobilizada em reator de leito fixo operando em regime contínuo.
- Estudar a estabilidade de atividade ou de conversão da lactose pela β -galactosidase de *Bacillus licheniformis* imobilizada em processo de agitação e em diferentes pressões.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-FATTAH, A. M., EL-GAMAL, M. S., ISMAIL, S. A., EMRAN, M. A., & HASHEM, A. M. Biodegradation of feather waste by keratinase produced from newly isolated *Bacillus licheniformis* ALW1. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 16, n. 2, p. 311-318, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2018.05.005>
- AHMAD, RAZI; SARDAR, MERYAM. Enzyme immobilization: an overview on nanoparticles as immobilization matrix. **Biochemistry and Analytical Biochemistry**, v. 4, n. 2, p. 1, 2015. <https://doi.org/10.4172/2161-1009.1000178>
- AKEED, YASSER; ATRASH, FAIZA & NAFFAA, WALID. Partial purification and characterization of chitinase produced by *Bacillus licheniformis* B307. **Heliyon**, v. 6, n. 5, p. e03858, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03858>
- ALBUQUERQUE, T. L. DE, 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>
- ANDRADE, B. C. DE, MIGLIAVACCA, V. F., OKANO, F. Y., GRAFULIN, V. Y., LUNARDI, J., ROTH, G., & VOLPATO, G. Production of recombinant β -galactosidase in bioreactors by fed-batch culture using DO-stat and linear control. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 37, n. 1, p. 3-9, 2019. <https://doi.org/10.1080/10242422.2018.1493105>
- ANSARI, SHAKEEL AHMED; DAMANHORY, AHMED ABDELGHANY. Biotechnological application of *Aspergillus oryzae* β -galactosidase immobilized on glutaraldehyde modified zinc oxide nanoparticles. **Heliyon**, v. 9, n. 2, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e13089>
- 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, p. 117637, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2019.117637>

BASSO, ALESSANDRA; SERBAN, SIMONA. Industrial applications of immobilized enzymes—A review. **Molecular Catalysis**, v. 479, p. 110607, 2019.

<https://doi.org/10.1016/j.mcat.2019.110607>

BAYLESS, THEODORE M.; BROWN, ELIZABETH; PAIGE, DAVID M. Lactase non-persistence and lactose intolerance. **Current gastroenterology reports**, v. 19, n. 5, p. 1-11, 2017. <https://doi.org/10.1007/s11894-017-0558-9>

BIBI, NOWSHAD; ALI, SIKANDER; TABASSUM, ROMANA. Statistical optimization of pectinase biosynthesis from orange peel by *Bacillus licheniformis* using submerged fermentation. **Waste and biomass valorization**, v. 7, n. 3, p. 467-481, 2016.

<https://doi.org/10.1007/s12649-015-9470-4>

BINHAYEEDING, N., YUNU, T., PICHID, N., KLOMKLAO, S., & SANGKHARAK, K. Immobilisation of *Candida rugosa* lipase on polyhydroxybutyrate via a combination of adsorption and cross-linking agents to enhance acylglycerol production. **Process Biochemistry**, v. 95, p. 174-185, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.02.007>

BOLIVAR, JUAN M. & GALLEGO, FERNANDO LÓPEZ. Characterization and evaluation of immobilized enzymes for applications in flow-reactors. **Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry**, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.cogsc.2020.04.010>

BOSSO, A., MORIOKA, L. R. I., SANTOS, L. F. D., & SUGUIMOTO, H. H. Lactose hydrolysis potential and thermal stability of commercial β -galactosidase in uht and skimmed milk. **Food science and technology**, v. 36, n. 1, p. 159-165, 2016.

<https://doi.org/10.1590/1678-457X.0085>

BRITTON, JOSHUA; MAJUMDAR, SUDIPTA; WEISS, GREGORY A. Continuous flow biocatalysis. **Chemical Society Reviews**, v. 47, n. 15, p. 5891-5918, 2018.

<https://doi.org/10.1039/C7CS00906B>

BURIAC, O., CIOPEC, M., DUȚEANU, N., NEGREA, A., NEGREA, P., & GROZAV, I. Platinum (IV) Recovery from Waste Solutions by Adsorption onto Dibenzo-30-crown-10 Ether Immobilized on Amberlite XAD7 Resin—Factorial Design Analysis. **Molecules**, v. 25, n. 16, p. 3692, 2020. <https://doi.org/10.3390/molecules25163692>

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>

CHOI, J. W., SONG, M. H., BEDIAKO, J. K., & YUN, Y. S. Sequential recovery of gold and copper from bioleached wastewater using ion exchange resins. **Environmental Pollution**, v. 266, p. 115167, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115167>

COSSIGNANI, L.; POLINI, L.; BLASI, F. Revisão convidada: Autenticação de leite por análise direta e indireta de espécies moleculares de triacilglicerol. **Journal of laticínios**, v. 102, n. 7, pág. 5871-5882, 2019. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-16318>

CORGNEAU, M., SCHER, J., RITIE-PERTUSA, L., LE, D. T., PETIT, J., NIKOLOVA, Y., & GAIANI, C. Recent advances on lactose intolerance: Tolerance thresholds and currently available answers. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 57, n. 15, p. 3344-3356, 2017. <https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1123671>

COSTA E SILVA, W., FREITAS, L., OLIVEIRA, P. C., & DE CASTRO, H. F. Continuous enzymatic biodiesel production from coconut oil in two-stage packed-bed reactor incorporating an extracting column to remove glycerol formed as by-product. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 39, n. 10, p. 1611-1617, 2016. <https://doi.org/10.1007/s00449-016-1636-3>

DANIEL, ROY M.; DANSON, MICHAEL J. A new understanding of how temperature affects the catalytic activity of enzymes. **Trends in biochemical sciences**, v. 35, n. 10, p. 584-591, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2010.05.001>

DATTA, SUMITRA; CHRISTENA, L. RENE; RAJARAM, YAMUNA RANI SRIRAMULU. Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. **3 Biotech**, v. 3, n. 1, p. 1-9, 2013. <https://doi.org/10.1007/s13205-012-0071-7>

DENG, Y., MISSELWITZ, B., DAI, N., & FOX, M. Lactose intolerance in adults: biological mechanism and dietary management. **Nutrients**, v. 7, n. 9, p. 8020-8035, 2015. <https://doi.org/10.3390/nu7095380>

DI COSTANZO, MARGHERITA; CANANI, ROBERTO BERNI. Lactose intolerance: common misunderstandings. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v. 73, n. 4, p. 30-37, 2018. <https://doi.org/10.1159/000493669>

ELSAYED, E. A., DANIAL, E. N., WADAAN, M. A., & EL-ENSHASY, H. A. Production of β -galactosidase in shake-flask and stirred tank bioreactor cultivations by a newly isolated *Bacillus licheniformis* strain. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 20, p. 101231, 2019.

<https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101231>

EMBRAPA. **Anuário-Leite** (2019). Disponível em:

<file:///D:/Users/ANA%20PAULA/Downloads/Anuario-LEITE-2019.pdf> (acesso em 23/07/2021)

ESKANDARLOO, HAMED; ABBASPOURRAD, ALIREZA. 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>

FACIONI, MS, RASPINI, B., PIVARI, F., DOGLIOTTI, E., & CENA, H. (2020). Manejo nutricional da intolerância à lactose: a importância da dieta e rotulagem dos alimentos. **Revista de medicina translacional** , v. 18, n. 1, pág. 1 a 9 de 2020..

<https://doi.org/10.1186/s12967-020-02429-2>

FALLEIROS, L. N. S. S., CABRAL, B. V., FISCHER, J., GUIDINI, C. Z., CARDOSO, V. L., & RIBEIRO, E. J. Improvement of recovered activity and stability of the *Aspergillus oryzae* β -galactosidase immobilized on duolite A568 by combination of immobilization methods. **Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly**, v. 23, n. 4, p. 495-506, 2017. <https://doi.org/10.2298/CICEQ160912010F>

FATHI, M., KARIM, M., KHOIGANI, S. R., & MOSAYEBI, V. Use of nanotechnology for immobilization and entrapment of food applicable enzymes. In: *Bioactive Molecules in Food*. **Springer, Cham**, 2019. p. 2037-2061. https://doi.org/10.1007/978-3-319-78030-6_52

FERNANDEZ-LOPEZ, L., PEDRERO, S. G., LOPEZ-CARROBLES, N., GORINES, B. C., VIRGEN-ORTÍZ, J. J., & FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Effect of protein load on stability of immobilized enzymes. **Enzyme and microbial technology**, v. 98, p. 18-25, 2017.

<https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2016.12.002>

GAO, ZHEN. Purification and characterization of a novel lichenase from *Bacillus licheniformis* GZ-2. **Biotechnology and applied biochemistry**, v. 63, n. 2, p. 249-256, 2016. <https://doi.org/10.1002/bab.1206>

GARCIA-GALAN, C., BERENGUER-MURCIA, Á., 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, 2011. <https://doi.org/10.1002/adsc.201100534>

GE, J. P., DU, R. P., ZHAO, D., SONG, G., JIN, M., & PING, W. X. Bio-chemical characterization of a β -mannanase from *Bacillus licheniformis* HDYM-04 isolated from flax water-retting liquid and its decolorization ability of dyes. **RSC advances**, v. 6, n. 28, p. 23612-23621, 2016. <https://doi.org/10.1039/C5RA25888J>

GENNARI, A., SIMON, R., DE MOURA SPEROTTO, N. D., BIZARRO, C. V., BASSO, L. A., MACHADO, P., ... & DE SOUZA, C. F. V. One-step purification of a recombinant beta-galactosidase using magnetic cellulose as a support: Rapid immobilization and high thermal stability. **Bioresource Technology**, v.345, p.126497, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126497>

GHOSH, ARABINDA; SUTRADHAR, SAIKAT; BAISHYA, DEBABRAT. Delineating thermophilic xylanase from *Bacillus licheniformis* DM5 towards its potential application in xylooligosaccharides production. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 35, n. 2, p. 34, 2019. <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2605-1>

GIL, ÁNGEL & ORTEGA, ROSA M. Introduction and executive summary of the supplement, role of milk and dairy products in health and prevention of noncommunicable chronic diseases: a series of systematic reviews. **Advances in Nutrition**, v. 10, n. suppl_2, p. S67-S73, 2019. <https://doi.org/10.1093/advances/nmz020>

GOMES, N. O., CARRILHO, E., MACHADO, S. A. S., & SGOBBI, L. F. Bacterial cellulose-based electrochemical sensing platform: A smart material for miniaturized biosensors. **Electrochimica Acta**, v. 349, p. 136341, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2020.136341>

GROSSO, GIUSEPPE. Milk and Chronic-Degenerative Diseases: Main Components and Potential Mechanisms. In: Dairy in Human Health and Disease Across the Lifespan.

Academic Press, 2017. p. 385-393. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809868-4.00030-3>

GUERRERO, C., VALDIVIA, F., UBILLA, C., RAMÍREZ, N., GÓMEZ, M., ABURTO, 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., SANTANA, L. N. S., CARDOSO, V. L., & RIBEIRO, E. J. Immobilization of *Aspergillus oryzae* β -galactosidase in ion exchange resins by combined ionic-binding method and cross-linking. **Biochemical Engineering Journal**, v. 52, n. 2-3, p. 137-143, 2010. <https://doi-org.ez34.periodicos.capes.gov.br/10.1016/j.bej.2010.07.013>

HARTLEY, C. J., WILLIAMS, C. C., SCOBLE, J. A., CHURCHES, Q. I., NORTH, A., FRENCH, N. G., ... & SCOTT, C. Engineered enzymes that retain and regenerate their cofactors enable continuous-flow biocatalysis. **Nature Catalysis**, v. 2, n. 11, p. 1006-1015, 2019. <https://doi.org/10.1038/s41929-019-0353-0>

HENLEY, J. P.; SADANA, A. Categorization of enzyme deactivations using a series-type mechanism. **Enzyme Microb. Technology**. v. 7, p. 50-60, 1985.

HETTIARACHCHY, N. S., FELIZ, D. J., EDWARDS, J. S., & HORAX, R. The use of immobilized enzymes to improve functionality. In **Proteins in food processing**, Woodhead Publishing, p. 569-597. 2018. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100722-8.00022-X>

HOMAEI, AA, SARIRI, R., VIANELLO, F., & STEVANATO, R. Imobilização enzimática: uma atualização. **Revista de biologia química**, v. 6, n. 4, pág. 185-205, 2013. <https://doi.org/10.1007/s12154-013-0102-9>

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATISTICA – IBGE. 2021. **Produção de Leite**. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/leite/br> (acesso em 21/01/2013).

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATISTICA – IBGE. 2022. **Estatística da Produção Pecuária**. Disponível em: https://ftp.ibge.gov.br/Producao_Pecuaria/Fasciculo_Indicadores_IBGE/abate-leite-couro-ovos_202202caderno.pdf (acesso em 21/01/2013).

IMAM, HASAN T.; MARR, PATRÍCIA C.; MARR, ANDREW C. Aprisionamento enzimático, imobilização de biocatalisador sem ligação covalente. **Química Verde**, v. 23, n. 14, pág. 4980-5005, 2021. <https://doi.org/10.1039/D1GC01852C>

JASIELSKA, MARTYNA; GRZYBOWSKA-CHLEBOWCZYK, URSZULA. Lactose malabsorption and lactose intolerance in children with inflammatory bowel diseases. **Gastroenterology research and practice**, v. 2019, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/2507242>

JIA, FENG; NARASIMHAN, BALAJI; MALLAPRAGADA, SURYA. Materials-based strategies for multi-enzyme immobilization and co-localization: a review. **Biotechnology and bioengineering**, v. 111, n. 2, p. 209-222, 2014. <https://doi.org/10.1002/bit.25136>

JIN, H. K.; YOON, K.; JIN, H. K. & YUN, K. H. Production and Characterization of beta-galactosidase from *Bacillus licheniformis* Isolated from Doenjang. **Microbiology and Biotechnology Letters**, v. 42, n. 4, p. 339-346, 2014. <https://doi.org/10.4014/kjmb.1410.10004>

KESSI, E.; ARIAS, J. L. Using natural waste material as a matrix for the immobilization of enzymes: chicken eggshell membrane powder for β -galactosidase immobilization. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 187, n. 1, p. 101-115, 2019. <https://doi.org/10.1007/s12010-018-2805-4>

KHAN, MARYAM; HUSAIN, QAYYUM. Multiwalled carbon nanotubes bound beta-galactosidase: It's activity, stability and reusability. **Methods in enzymology**, v. 630, p. 365-405, 2020. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2019.10.018>

KLEIN, M. P., HACKENHAAR, C. R., LORENZONI, A. S., RODRIGUES, R. C., COSTA, T. M., 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>

KOLA, V. S. R., RENUKA, P., MADHAV, M. S., & MANGRAUTHIA, S. K.. Key enzymes and proteins of crop insects as candidate for RNAi based gene silencing. **Frontiers in physiology**, v. 6, p. 119, 2015. <https://doi.org/10.3389/fphys.2015.00119>

Križnik, L., Vasić, K., Knez, Ž., & Leitgeb, M. Hyper-activation of β -galactosidase from *Aspergillus oryzae* via immobilization onto amino-silane and chitosan magnetic maghemite nanoparticles. **Journal of cleaner production**, v. 179, p. 225-234, 2018..

<https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.01.117>

KURIBAYASHI, L. M., do RIO RIBEIRO, V. P., DE SANTANA, R. C., RIBEIRO, E. J., dos SANTOS, M. G., FALLEIROS, L. N. S. S., & GUIDINI, C. Z. Immobilization of β -galactosidase from *Bacillus licheniformis* for application in the dairy industry. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 105, n. 9, p. 3601-3610, 2021.

<https://doi.org/10.1007/s00253-021-11325-8>

LALANDE, M., SCHWOB, L., VIZCAINO, V., CHIROT, F., DUGOURD, P., SCHLATHÖLTER, T., & POULLY, J. C. Direct radiation effects on the structure and stability of collagen and other proteins. **ChemBioChem**, v. 20, n. 24, p. 2972-2980, 2019.

<https://doi.org/10.1002/cbic.201900202>

LIAN, X., FANG, Y., JOSEPH, E., WANG, Q., LI, J., BANERJEE, S., ... & ZHOU, H. C. Enzyme–MOF (metal–organic framework) composites. **Chemical Society Reviews**, v. 46, n. 11, p. 3386-3401, 2017. <https://doi.org/10.1039/C7CS00058H>

LIMA, A. F., CAVALCANTE, K. F., DE FREITAS, M. D. 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, n. 3, p. 443-452, 2013.

<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2013.02.002>

LI, T., WANG, H., LI, J., JIANG, L., KANG, H., GUO, Z., ... & LIU, Y. Enzymatic characterization, molecular dynamics simulation, and application of a novel *Bacillus licheniformis* laccase. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 167, p. 1393-1405, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.11.093>

LI, Y., JIN, K., ZHANG, L., DING, Z., GU, Z., & SHI, G. Development of an inducible secretory expression system in *Bacillus licheniformis* based on an engineered xylose operon. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 66, n. 36, p. 9456-9464, 2018.

<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b02857>

LI, Y., XU, X., LIU, L., KUANG, H., XU, L., & XU, C. Rapid detection of 21 β -lactams using an immunochromatographic assay based on the mutant BlaR-CTD protein from *Bacillus Licheniformis*. **Analyst**, v. 145, n. 9, p. 3257-3265, 2020.

<https://doi.org/10.1039/D0AN00421A>

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

LIU, X., YANG, H., YE, Y., & PAN, L. Identification of strong promoters based on the transcriptome of *Bacillus licheniformis*. **Biotechnology letters**, v. 39, n. 6, p. 873-881, 2017. <https://doi.org/10.1007/s10529-017-2304-7>

MAITY, M.; BHATTACHARYYA, A.; BHOWAL, J. Production and immobilization of β -galactosidase isolated from *Enterobacter aerogenes* KCTC2190 by entrapment method using agar-agar organic matrix. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 193, n. 7, p. 2198-2224, 2021. <https://doi.org/10.1007/s12010-021-03534-8>

MALEKABADI, SAEID; BADOEI-DALFARD, ARASTOO; KARAMI, ZAHRA. Biochemical characterization of a novel cold-active, halophilic and organic solvent-tolerant lipase from *B. licheniformis* KM12 with potential application for biodiesel production. **International journal of biological macromolecules**, v. 109, p. 389-398, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.11.173>

MARTARELLO, R. D. A., CUNHA, L., CARDOSO, S. L., DE FREITAS, M. M., SILVEIRA, D., FONSECA-BAZZO, Y. M., & MAGALHÃES, P. O. Optimization and partial purification of beta-galactosidase production by *Aspergillus niger* isolated from Brazilian soils using soybean residue. **AMB Express**, v. 9, n. 1, p. 1-13, 2019. <https://doi.org/10.1186/s13568-019-0805-6>

MATEO, C., PALOMO, J. M., FERNANDEZ-LORENTE, G., GUISAN, J. M., & FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme and microbial technology**, v. 40, n. 6, p. 1451-1463, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2007.01.018>

MATTE, C. R., BORDINHÃO, C., POPPE, J. K., RODRIGUES, R. C., HERTZ, P. F., & AYUB, M. A. Synthesis of butyl butyrate in batch and continuous enzymatic reactors using

Thermomyces lanuginosus lipase immobilized in Immobead 150. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 127, p. 67-75, 2016.

<https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2016.02.016>

MAZIDI, M., MIKHAILIDIS, D. P., SATTAR, N., HOWARD, G., GRAHAM, I., BANACH, M., & Lipid and Blood Pressure Meta-analysis Collaboration. (2019).

Consumption of dairy product and its association with total and cause specific mortality—A population-based cohort study and meta-analysis. **Clinical Nutrition**, v. 38, n. 6, p. 2833-2845, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2018.12.015>

MEHTA, BHAVBHUTI M. Chemical composition of milk and milk products. **Handbook of food chemistry**, p. 511-553, 2015. https://doi.org/10.1007/978-3-642-36605-5_31

MIRSALAMI, SEYED MEHRDAD; ALIHOSSEINI, AFSHAR. Selection of the most effective kinetic model of lactase hydrolysis by immobilized *Aspergillus niger* and free β -galactosidase. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 25, n. 12, p. 101395, 2021.

<https://doi.org/10.1016/j.jscs.2021.101395>

MISSION, M., JIN, B., CHEN, B., & ZHANG, H. Enhancing enzyme stability and metabolic functional ability of β -galactosidase through functionalized polymer nanofiber immobilization. **Bioprocess and biosystems engineering**, v. 38, n. 10, p. 1915-1923, 2015.

<https://doi.org/10.1007/s00449-015-1432-5>

MORÉ, 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.

MÜLLER, THAÍS; REMPEL, CLAUDETE. Qualidade do leite bovino produzido no Brasil—parâmetros físico-químicos e microbiológicos: uma revisão integrativa. *Vigilância Sanitária em Debate: Sociedade, Ciência & Tecnologia (Health Surveillance under Debate: Society, Science & Technology)—Visa em Debate*, 2021. <https://doi.org/10.22239/2317-269x.01738>

NADAR, SHAMRAJA S.; VAIDYA, LEENA; RATHOD, VIRENDRA K. Enzyme embedded metal organic framework (enzyme—MOF): De novo approaches for immobilization. **International journal of biological macromolecules**, v. 149, p. 861-876, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.01.240>

NETO, C. A. C. G., E SILVA, N. C. G., DE OLIVEIRA COSTA, T., DE ALBUQUERQUE, T. L., GONÇALVES, L. R. B., FERNANDEZ-LAFUENTE, R., & ROCHA, M. V. P. The β -

galactosidase immobilization protocol determines its performance as catalysts in the kinetically controlled synthesis of lactulose. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 176, p. 468-478, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.02.078>

NGUYEN, V.D., STYEVKÓ, G., MADARAS, E., HAKTANIRLAR, G., TRAN, A.T., BUJNA, E., ... & 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>

ONG, CHONG-BOON; ANNUAR, MOHAMAD SM. Immobilization of cross-linked tannase enzyme on multiwalled carbon nanotubes and its catalytic behavior. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 48, n. 2, p. 181-187, 2018. <https://doi.org/10.1080/10826068.2018.1425707>

PANDEY, DEEPSHIKHA; DAVEREY, ACHLESH; ARUNACHALAM, KUSUM. BIOCHAR: Production, properties and emerging role as a support for enzyme immobilization. **Journal of Cleaner Production**, v. 255, p. 120267, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.120267>

PAWAR, SHWETA V.; RATHOD, VIRENDRA K. Ultrasound assisted process intensification of uricase and alkaline protease enzyme co-production in *Bacillus licheniformis*. **Ultrasonics sonochemistry**, v. 45, p. 173-179, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2018.03.004>

POPPE, J. K., FERNANDEZ-LAFUENTE, R., RODRIGUES, R. C., & AYUB, M. A. Z. Enzymatic reactors for biodiesel synthesis: present status and future prospects. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 5, p. 511-525, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.01.011>

POPPE, J. K., MATTE, C. R., DE FREITAS, V. O., FERNANDEZ-LAFUENTE, R., RODRIGUES, R. C., & ZÁCHIA AYUB, M. A. Enzymatic synthesis of ethyl esters from waste oil using mixtures of lipases in a plug-flow packed-bed continuous reactor. **Biotechnology progress**, v. 34, n. 4, p. 952-959, 2018. <https://doi.org/10.1002/btpr.2650>

POTTRATZ, INES; MÜLLER, INES; HAMEL, CHRISTOF. Potential and Scale-Up of Pore-Through-Flow Membrane Reactors for the Production of Prebiotic Galacto-

Oligosaccharides with Immobilized β -Galactosidase. **Catalysts**, v. 12, n. 1, p. 7, 2022.

<https://doi.org/10.3390/catal12010007>

RADIATI, Lilik Eka; JAYA, Firman; OKTAVIA, Hedy. Effect of carrot-juice on exopolisaccharides and β -D galactosidase activity in yogurt. **Animal production**, v. 18, n. 3, p. 173-179, 2016. <http://dx.doi.org/10.20884/1.anprod.2016.18.3.577>

RANI, VARSHA; SHARMA, PARUL; DEV, KAMAL. Characterization of thermally stable β galactosidase from *Anoxybacillus flavithermus* and *Bacillus licheniformis* isolated from tattapani hot spring of North Western Himalayas, India. **Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci**, v. 8, n. 1, p. 2517-2542, 2019. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2019.801.266>

RIBEIRO, E. S., DE FARIAS, B. S., JUNIOR, T. R. S. A. C., DE ALMEIDA PINTO, L. A., & DIAZ, P. S. Chitosan-based nanofibers for enzyme immobilization. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 183, p. 1959-1970, 2021.

<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.05.214>

RODRIGUEZ-COLINAS, B., FERNANDEZ-ARROJO, L., SANTOS-MORIANO, P., BALLESTEROS, A. O., & PLOU, F. J. Continuous packed bed reactor with immobilized β -galactosidase for production of galactooligosaccharides (GOS). **Catalysts**, v. 6, n. 12, p. 189, 2016. <https://doi.org/10.3390/catal6120189>

SAQIB, S., AKRAM, A., HALIM, S. A., & TASSADUQ, R. Sources of β -galactosidase and its applications in food industry. **3 Biotech**, v. 7, n. 1, p. 79, 2017.

<https://doi.org/10.1007/s13205-017-0645-5>

SANTIAGO, P. A., MARQUEZ, L. D. S., CARDOSO, V. L., et al. "Estudo da produção de beta-galactosidase por fermentação de soro de queijo com *Kluyveromyces marxianus*", **Food Science and Technology**, v. 24, n. 4, p. 567–572, dez. 2004. DOI: 10.1590/S0101-20612004000400015

SANTOS, GEISA J.; ROCHA, RAQUEL; SANTANA, GENOILE O. Lactose intolerance: what is a correct management?. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 65, n. 2, p. 270-275, 2019. <https://doi.org/10.1590/1806-9282.65.2.270>

SASS, ANN-CATHÉRINE; JÖRDENING, HANS-JOACHIM. Immobilization of β -galactosidase from *Aspergillus oryzae* on electrospun gelatin nanofiber mats for the

production of galactooligosaccharides. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 191, n. 3, p. 1155-1170, 2020. <https://doi.org/10.1007/s12010-020-03252-7>

SELVARAJAN, E., MOHANASRINIVASAN, V., SUBATHRA DEVI, C., & GEORGE PRIYA DOSS, C. Immobilization of β -galactosidase from *Lactobacillus plantarum* HF571129 on ZnO nanoparticles: characterization and lactose hydrolysis. **Bioprocess and biosystems engineering**, v. 38, n. 9, p. 1655-1669, 2015. <https://doi.org/10.1007/s00449-015-1407-6>

SEREY, M., VERA, C., GUERRERO, C., & ILLANES, A. Immobilization of *Aspergillus oryzae* β -galactosidase in cation functionalized agarose matrix and its application in the synthesis of lactulose. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 167, p. 1564-1574, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.11.110>

SEWALT, VINCENT J.; REYES, TERESA F.; BUI. Quang. Safety evaluation of two α -amylase enzyme preparations derived from *Bacillus licheniformis* expressing an α -amylase gene from *Cytophaga* species. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 98, p. 140-150, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2018.07.015>

SHAFI, AZRA; AHMED, FAIZAN; HUSAIN, QAYYUM. 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>

SHELDON, ROGER A. Enzyme immobilization: the quest for optimum performance. **Advanced Synthesis & Catalysis**, v. 349, n. 8-9, 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>

SILVA, RENE A.; HAWBOLDT, KELLY; ZHANG, YAHUI. Application of resins with functional groups in the separation of metal ions/species—a review. **Mineral Processing and Extractive Metallurgy Review**, v. 39, n. 6, p. 395-413, 2018. <https://doi.org/10.1080/08827508.2018.1459619>

SIRISHA, VIPPULA L.; JAIN, ANKITA; JAIN, AMITA. Enzyme immobilization: an overview on methods, support material, and applications of immobilized enzymes. **Advances in food and nutrition research**, v. 79, p. 179-211, 2016.

<https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2016.07.004>

SNEHA, H. P.; BEULAH, K. C.; MURTHY, PUSHPA S. Enzyme immobilization methods and applications in the food industry. In: *Enzymes in food biotechnology*. **Academic Press**, 2019. p. 645-658. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813280-7.00037-2>

SOUZA, C. J., GARCIA-ROJAS, E. E., SOUZA, C. S., VRIESMANN, L. C., VICENTE, J., DE CARVALHO, M. G., ... & 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>

SPAHN, CYNTHIA & MINTEER, SHELLEY D. Enzyme immobilization in biotechnology. **Recent patents on engineering**, v. 2, n. 3, p. 195-200, 2008..

<https://doi.org/10.2174/187221208786306333>

THOMPSON, M. P., PEÑAFIEL, I., COSGROVE, S. C., & TURNER, N. J. Biocatalysis using immobilized enzymes in continuous flow for the synthesis of fine chemical. **Organic Process Research & Development**, v. 23, n. 1, p. 9-18, 2018.

<https://doi.org/10.1021/acs.oprd.8b00305>

ULLAH, H., PERVEZ, S., AHMED, S., HALEEM, K. S., QAYYUM, S., NIAZ, Z., ... & TAUSEEF, I. Preparation, characterization and stability studies of cross-linked α -amylase aggregates (CLAAs) for continuous liquefaction of starch. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 173, p. 267-276, 2021.

<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.01.057>

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

VASILEVA, N., IVANOV, Y., DAMYANOVA, S., KOSTOVA, I., & GODJEVARGOVA, T. Hydrolysis of whey lactose by immobilized β -galactosidase in a bioreactor with a spirally

wound membrane. **International journal of biological macromolecules**, v. 82, p. 339-346, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.11.025>

VASUDHA, M., KALASAD, M. N., SHARATH, S. C., & GAYATHRI, D. Fourier transform infrared spectroscopy analysis of Lactose hydrolysis by beta-galactosidase from *Lactiplantibacillus plantarum* GV54 and *Lactiplantibacillus* sp. GV66. **Biomedicine**, v. 43, n. 1, p. 146-150, 2023. <https://doi.org/10.51248/.v43i1.2577>

VERA, C., GUERRERO, C., ABURTO, C., CORDOVA, A., & ILLANES, A. Conventional and non-conventional applications of β -galactosidases. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics**, v. 1868, n. 1, p. 140271, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2019.140271>

WAHAB, M. K. H. A., EL-ENSHASY, H. A., BAKAR, F. D. A., MURAD, A. M. A., JAHIM, J. M., & ILLIAS, R. M. Improvement of cross-linking and stability on cross-linked enzyme aggregate (CLEA)-xylanase by protein surface engineering. **Process Biochemistry**, v. 86, p. 40-49, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.07.017>

XAVIER, JANIFER RAJ; RAMANA, KARNA VENKATA; SHARMA, RAKESH KUMAR. β -galactosidase: Biotechnological applications in food processing. **Journal of Food Biochemistry**, v. 42, n. 5, p. e12564, 2018. <https://doi.org/10.1111/jfbc.12564>

XU, M., JI, D., DENG, Y., & AGYEI, D. Preparation and assessment of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) of β -galactosidase from *Lactobacillus leichmannii* 313. **Food and Bioproducts Processing**, v. 124, p. 82-96, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2020.08.004>

YADAV, A., PANDEY, S. K., AGRAWAL, D. C., MISHRA, H., SRIVASTAVA, A., & KAYASTHA, A. M. Carbon nanotubes molybdenum disulfide 3D nanocomposite as novel nanoscaffolds to immobilize *Lens culinaris* β -galactosidase (Lsbgal): robust stability, reusability, and effective bioconversion of lactose in whey. **Food chemistry**, v. 297, p. 125005, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125005>

YE, J., LI, A., CHU, T., PAN, X., & HE, B. Poly-lysine supported cross-linked enzyme aggregates of penicillin G acylase and its application in synthesis of β -lactam antibiotics. **International journal of biological macromolecules**, v. 140, p. 423-428, 2019.. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.08.021>

YU, L.; O'SULLIVAN, D. J. Immobilization of whole cells of *Lactococcus lactis* containing high levels of a hyperthermostable β -galactosidase enzyme in chitosan beads for efficient galacto-oligosaccharide production. **Journal of dairy science**, v. 101, n. 4, p. 2974-2983, 2018. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13770>

YU, EDWARD; HU, FRANK B. Dairy products, dairy fatty acids, and the prevention of cardiometabolic disease: a review of recent evidence. **Current atherosclerosis reports**, v. 20, n. 5, p. 1-9, 2018. <https://doi.org/10.1007/s11883-018-0724-z>

YUSHKOVA, E. D., NAZAROVA, E. A., MATYUHINA, A. V., NOSKOVA, A. O., SHAVRONSKAYA, D. O., VINOGRADOV, V. V., & KRIVOSHAPKINA, E. F. Application of immobilized enzymes in food industry. **Journal of agricultural and food chemistry, Journal of agricultural and food chemistry**, v. 67, n. 42, p. 11553-11567, 2019. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b04385>

ZAAK, H., PEIRCE, S., DE ALBUQUERQUE, T. L., SASSI, M., & FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Exploiting the versatility of aminated supports activated with glutaraldehyde to immobilize β -galactosidase from *Aspergillus oryzae*. **Catalysts**, v. 7, n. 9, p. 250, 2017. <https://doi.org/10.3390/catal7090250>

ZDARTA, J., MEYER, A. S., JESIONOWSKI, T., & PINELO, M. A general overview of support materials for enzyme immobilization: characteristics, properties, practical utility. **Catalysts**, v. 8, n. 2, p. 92, 2018. <https://doi.org/10.3390/catal8020092>

FENG, K., HUANG, Z., PENG, B., DAI, W., LI, Y., ZHU, X., ... & CAO, Y. Immobilization of *Aspergillus niger* lipase onto a novel macroporous acrylic resin: Stable and recyclable biocatalysis for deacidification of high-acid soy sauce residue oil. **Bioresource technology**, v. 298, p. 122553, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122553>

ZHANG, J., DAI, Y., JIANG, B., ZHANG, T., & CHEN, J. Dual-enzyme co-immobilization for the one-pot production of glucose 6-phosphate from maltodextrin. **Biochemical Engineering Journal**, v. 161, p. 107654, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2020.107654>

ZHANG, L., CHEN, X. D., BOOM, R. M., & SCHUTYSER, M. A. Thermal inactivation kinetics of β -galactosidase during bread baking. **Food chemistry**, v. 225, p. 107-113, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.01.010>

ZHOU, QUINN ZK; CHEN, XIAO DONG. Effects of temperature and pH on the catalytic activity of the immobilized β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 9, n. 1, p. 33-40, 2001. [https://doi.org/10.1016/S1369-703X\(01\)00118-8](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(01)00118-8)

ZHU, Y., CHEN, Q., SHAO, L., JIA, Y., & ZHANG, X. Microfluidic immobilized enzyme reactors for continuous biocatalysis. **Reaction Chemistry & Engineering**, v. 5, n. 1, pág. 9-32, 2020. <https://doi.org/10.1039/C9RE00217K>

SANTANA, J. L., OLIVEIRA, J. M., NASCIMENTO, J. S., MATTEDI, S., KRAUSE, L. C., FREITAS, L. S., ... & SOARES, C. M. Continuous flow reactor based with an immobilized biocatalyst for the continuous enzymatic transesterification of crude coconut oil. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 67, n. 3, p. 404-413, 2020. <https://doi.org/10.1002/bab.1885>