

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**SÍNTESE DE GALACTO-OLIGOSSACARÍDEOS A PARTIR DE SORO DE LEITE EM
DIFERENTES TIPOS DE REATORES COM A ENZIMA β -GALACTOSIDASE**

Poliana Carneiro Tiosso
Eng^o. Químico, UEM, 2006
Mestre Eng^a. Química, UEM, 2010
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Gisella Maria Zanin
Coorientador: Prof. Flávio Faria de Moraes, PhD


Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Estadual de Maringá, como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de Doutor, na área de concentração de Desenvolvimento de Processos.

Maringá
2019

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

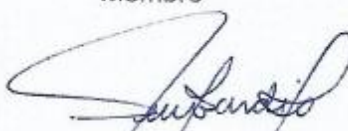
Esta é a versão final da Tese de Doutorado apresentada por Poliana Carneiro Tiosso perante a Comissão Julgadora do Curso de Doutorado em Engenharia Química em 21 de junho de 2019.

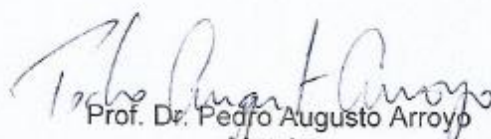
COMISSÃO JULGADORA


Prof.^a Dr.^a Gisella Maria Zanin
Presidente/Orientadora


Prof. Dr. Flávio Faria de Moraes
Coorientador


Prof.^a Dr.^a Gleide Mara Faria Soares
Membro


Prof. Dr. Paulo Waldir Tardioli
Membro


Prof. Dr. Pedro Augusto Arroyo
Membro


Prof. Dr. João Henrique Vantas
Membro

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá - PR, Brasil)

T594s	<p>Tiosso, Poliana Carneiro</p> <p>Síntese de galacto-oligossacarídeos a partir de soro de leite em diferentes tipos de reatores com a enzima -galactosidade / Poliana Carneiro Tiosso. -- Maringá, PR, 2019. xvii, 198 f.: il. color.</p> <p>Orientadora: Profa. Dra. Gisella Maria Zanin. Coorientador: Prof. Dr. Flávio Faria de Moraes. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Tecnologia, Departamento de Engenharia Química, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, 2019.</p> <p>1. Enzimas. 2. Imobilização Enzimática. 3. Biocatálise. 4. Sílica Macroporosa. 5. Galacto-oligossacarídeos. I. Zanin, Gisella Maria, orient. II. Moraes, Flávio Faria de, coorient. III. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Tecnologia. Departamento de Engenharia Química. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. IV. Título.</p> <p>CDD 23.ed. 660.634</p>
-------	--

*Dedico este trabalho aos meus pais, Sueli e José Carlos;
e à minha querida irmã Kauhana,
pelo apoio, compreensão e amor incondicional em todos os momentos desta
e de outras caminhadas.
E, em especial a Deus, que é a maior razão do meu viver.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por esta conquista, por permitir, nestes tempos de desafios e aprendizados, descobrir amigos que são tesouros de Deus em minha vida...

Pai e mãe, muito obrigada por tudo que fizeram e fazem por mim...

À minha irmã Kauhana, pela amizade e parceria em todos os momentos...

À toda minha família pelo apoio e torcida...

Aos meus amigos, por iluminar a minha vida...

À Prof. Dra. Gisella Maria Zanin e ao Prof. Flávio Faria de Moraes, Ph.D pela orientação, amizade, permanente incentivo e oportunidade de participar neste projeto...

Ao Prof. Paulo Waldir Tardioli por toda ajuda e disponibilidade para sempre me ajudar com minhas dúvidas...

À Prof. Dra. Graciette pela disponibilidade em usar seu laboratório e à toda sua equipe de pesquisa, especialmente ao Vanderson C. Fenelon, Ph.D e à Carolina P. Francisco; pela ajuda técnica...

A todos os membros do Laboratório do Professor Dr. Pedro Arroyo, especialmente o Marcus Pereira e a Carina Araki....

Aos professores e técnicos da UEM, em especial à Luiza e ao Lauro, pela paciência e dedicação...

Aos colegas de trabalho do DEQ, especialmente João Henrique Dantas, Leonardo Brunelli do Nascimento e Deise Molinari...

Às alunas de Iniciação Científica Ana Heloísa Venzel e Thaís Eloá Venzel pela ajuda concedida....

A todos colaboradores da Comcap (UEM) por todas as análises realizadas...

À banca examinadora por terem aceitado o convite e contribuído para o enriquecimento do trabalho...

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Estadual de Maringá, pela oportunidade concedida...

Ao CNPQ pela confiança depositada e suporte financeiro...

Enfim, agradeço a todos que contribuíram para a conclusão desta etapa, que é apenas o início de um novo tempo, que trará consigo muitas vitórias...

Que venha o tempo...

“Ainda que eu fale a língua dos homens
e dos anjos, se não tiver amor,
serei como o bronze que soa, ou como
o címbalo que retine.

Ainda que eu tenha o dom de profetizar
e conheça todos os mistérios e toda a ciência;
ainda que eu tenha tamanha fé a ponto
de transportar montanhas,
se não tiver amor nada serei.

Ainda que eu distribua todos os
meus bens entre os pobres
e ainda que entregue meu próprio
corpo para ser queimado,
se não tiver amor,
nada disso me aproveitará.”

TRECHO DA CARTA DE SÃO PAULO AOS CORÍNTIOS (13, 1-3)

SÍNTESE DE GALACTO-OLIGOSSACARÍDEOS A PARTIR DE SORO DE LEITE EM DIFERENTES TIPOS DE REATORES COM A ENZIMA β -GALACTOSIDASE

RESUMO

A imobilização de enzimas é uma metodologia relativamente simples e oferece muitas vantagens, por exemplo: a reutilização eficiente da enzima, uma operação contínua, maior estabilidade térmica e operacional. As β -galactosidasas pertencem ao grupo de enzimas que têm despertado crescente interesse por parte da indústria de alimentos, devido à sua capacidade de hidrolisar a lactose e de produzir galacto-oligosacarídeos (GOS). Os GOS são considerados prebióticos, pois são usados de forma seletiva por bactérias consideradas benéficas (probióticos) em detrimento das bactérias patogênicas, com diversos benefícios à saúde. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi estudar a síntese de GOS utilizando β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* imobilizada em suportes à base de sílica macroporosa e soro de leite como substrato para a síntese. Inicialmente foi preparado um suporte pela silanização de sílica macroporosa, ativada com GPTMS. A imobilização da β -galactosidase foi realizada incubando-se, durante 48 h, uma solução enzimática com o suporte obtido. A atividade enzimática da β -galactosidase solúvel e imobilizada foi determinada como uma função do pH (6,0; 6,5; 7,0 e 7,5) e da temperatura (30, 35, 40, 45 e 50 °C) e, em seguida, foram obtidas as condições para a atividade máxima. Visando aumentar a estabilidade térmica da enzima, foi estudada a reação de reticulação pós-imobilização com diferentes concentrações de glutaraldeído (0,1; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 %). Foi estudada a estabilidade térmica da enzima e determinadas as melhores condições para realizar reações em longos períodos (20 h). Esses experimentos foram realizados em reator batelada, e a atividade determinada pelo método das velocidades iniciais. A síntese de GOS foi estudada com a enzima imobilizada em diferentes tampões (acetato, fosfato e uma formulação especial), temperatura (40, 45 e 50 °C), concentração inicial de lactose no soro de leite (30, 40 e 50 % (m/v)) e tipo de reator (batelada, batelada alimentada e contínuo) e, posteriormente analisada por cromatografia líquida de alta eficiência, para quantificação dos açúcares. A concentração inicial de lactose no meio reacional e o tipo do reator foi o parâmetro que mais influenciou na síntese de GOS, sendo que a concentração máxima de GOS obtida foi de 355,79 g L⁻¹ com rendimento de 67,44 %, no reator contínuo. A partir destes resultados, pode-se concluir que a β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* imobilizada em sílica macroporosa apresentou bom rendimento na síntese de GOS a partir do soro de leite. Esse produto enriquecido com GOS pode ser usado em bebidas lácteas, iogurtes e leite em pó infantil.

Palavras-chave: Galacto-oligossacarídeos, β -galactosidase, Imobilização Enzimática, Soro de Leite, Sílica Macroporosa, Batelada, CSTR, Batelada alimentada, Transgalactosilação.

SYNTHESIS OF GALACTO-OLIGOSACCHARIDES FROM WHEY IN DIFFERENT TYPES OF REACTORS BY THE β -GALACTOSIDASE ENZYME

ABSTRACT

Enzyme immobilization is a relatively simple methodology and offers many advantages, for example: efficient reuse of the enzyme, continuous operation, increased thermal and operational stability. β -galactosidases belong to the group of enzymes that have aroused stimulated growing interest in the food industry due to their ability to hydrolyze lactose and produce galacto-oligosaccharides (GOS). GOS are considered prebiotics because they are selectively used by bacteria considered beneficial (probiotics) to the detriment of pathogenic bacteria, with several health benefits. Thus, study the synthesis of GOS using *Kluyveromyces lactis* β -galactosidase immobilized on supports based on macroporous silica and whey as a substrate for the synthesis. Initially, a support was prepared by the silanization of macroporous silica, activated with GPTMS. Immobilization of β -galactosidase was performed by incubating for 48h an enzyme solution with the support obtained. The enzymatic activity of soluble and immobilized β -galactosidase was determined as a function of pH (6.0, 6.5, 7.0 and 7.5), temperature (30, 35, 40, 45 and 50 °C) and then the conditions for maximum activity were obtained. For increasing the thermal stability of the immobilized enzyme, post-immobilization crosslinking with different concentrations of glutaraldehyde (0.1, 0.5, 1.0, 1.5 and 2.0 %) was studied. The thermal stability of the enzyme was determined to seek for the best conditions to carry out reactions in long runs (20 h). These experiments were performed in a batch reactor, and the activity determined by the initial velocity method. GOS synthesis was studied with the enzyme immobilized in different conditions: buffers (acetate, phosphate and a unique formulation), temperature (40, 45 and 50 °C), initial lactose concentration in the whey (30, 40 and 50 % (m/v)) and type of reactor (batch, fed-batch and continuous) and then analyzed by high performance liquid chromatography for quantification of sugars. The initial concentration of lactose in the reaction medium and the type of reactor was the parameter that most influenced GOS synthesis, and the maximum concentration of GOS obtained was 355.79 g L⁻¹ with a yield of 67.44 % in the continuous reactor. From these results, it can be concluded that the β -galactosidase of *Kluyveromyces lactis* immobilized on macroporous silica gave a good yield in the synthesis of GOS from the whey. This product enriched with GOS can be used in dairy drinks, yogurts and infant milk powder.

Keywords: Galacto-oligosaccharides, β -galactosidase, Enzymatic Immobilization, Whey, macroporous silica, Batch, CSTR, Feed-batch, Transgalactosylation.

SUMÁRIO

1.	CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO	1
2.	CAPÍTULO II – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
	2.1 Produção, Consumo de Leite e o Problema de Intolerância à Lactose.....	5
	2.2 Soro de Leite	11
	2.3 Lactose	15
	2.4 Hidrólise da Lactose	18
	2.5 Enzimas	21
	2.6 Enzima β -galactosidase.....	23
	2.6.1 Mecanismo de ação da enzima β -galactosidase.....	27
	2.6.2 Aplicações da β -galactosidase	29
	2.7 Probióticos, Prebióticos e Simbióticos	31
	2.8 Oligossacarídeos	33
	2.9 Galacto-oligossacarídeos (GOS)	35
	2.9.1 Condições para a Formação de GOS	39
	2.10 Enzimas Imobilizadas	42
	2.10.1 Efeitos da Imobilização sobre as Propriedades Enzimáticas	43
	2.10.2 Métodos de Imobilização Enzimática.....	46
	2.10.3 Suportes para Imobilização	50
	2.10.3.1 Sílica.....	52
	2.10.3.2 Modificação da Superfície da Sílica	54
	2.10.4 Modificações na Enzima Pós-imobilização	56
	2.10.5 Propriedades Catalíticas da Enzima Solúvel e Imobilizada	57
	2.10.5.1 Influência do pH na Atividade e Estabilidade das Enzimas	57
	2.10.5.2 Influência da Temperatura na Atividade e Estabilidade das Enzimas ..	58
	2.10.5.3 Energia de Ativação da Reação.....	59
	2.10.5.4 Energia de Desnaturação Térmica	59
	2.10.5.5 Estabilidade Operacional.....	61
	2.10.6 Tipos de Reatores para Enzimas Imobilizadas	62
	2.10.6.1. Reator Batelada	63
	2.10.6.2 Reator Contínuo (CSTR)	63

2.10.6.3	Reator batelada alimentada	64
2.11	Imobilização de β -galactosidase e Produção de Galacto-oligossacarídeos	64
2.12	Considerações Finais	69
3.	CAPÍTULO III - MATERIAIS E MÉTODOS	70
3.1	3.1 Materiais.....	71
3.1.1	Substrato	71
3.1.2	Solução Tampão de Formulação Especial	71
3.2	Métodos	73
3.2.1.	Determinação da Concentração de Glicose	73
3.2.2.	Teor de Proteína da Enzima.....	74
3.2.3.1	Método das Velocidades Iniciais.....	74
3.2.4.	Propriedades Catalíticas da Enzima β -Galactosidase Solúvel	75
3.2.4.1.	Atividade Específica em Função do pH e da Temperatura.....	75
3.2.4.2	Estabilidade Térmica da Enzima	76
3.2.5.1	Modificação Química da Sílica	77
3.2.5.2	Reação de Imobilização da enzima	78
3.2.5.3	Reticulação com Glutaraldeído após a Imobilização.....	78
3.2.6.1	Determinação da Quantidade de Enzima Fixada	79
3.2.6.2	Determinação da Atividade da Enzima Imobilizada.....	79
3.2.6.3	Cálculo dos Parâmetros de Imobilização.....	80
3.2.7	Caracterização do Suporte	80
3.2.7.1	Quantificação de Grupos Aldeídos	80
3.2.7.2	Adsorção de Nitrogênio (BET).....	81
3.2.7.3	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	82
3.2.8	Propriedades Catalíticas da Enzima β -Galactosidase Imobilizada	82
3.2.9	Tempo de Meia-Vida a 45 °C	85
3.2.10	Reações de Hidrólise da Lactose	85
3.2.11	Estabilidade Operacional	86
3.2.12	Produção de Galacto-oligossacarídeos	86
3.2.12.1	Síntese em Reator Batelada	87
3.2.12.2	Síntese em Reator Batelada Alimentada.....	88
3.2.12.3	Síntese em Reator Contínuo (CSTR)	89
3.2.13	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	90
3.2.13.1	Curva padrão	90
3.2.13.2	Amostras.....	90

4.	CAPÍTULO IV - RESULTADOS E DISCUSSÃO	93
4.1	Obtenção das Curvas de Calibração de Glicose e Proteína.....	93
4.1.1	Curva de Calibração de Glicose	93
4.1.2	Curva de Calibração de Proteína.....	94
4.2	Atividade Enzimática da β -Galactosidase Solúvel.....	94
4.3	Propriedades Catalíticas da Enzima β -Galactosidase Solúvel	94
4.3.1	Atividade Específica em Função do pH e da Temperatura.....	95
4.3.2	Estabilidade Térmica.....	96
4.4	Imobilização Enzimática	98
4.5	Propriedades Catalíticas da Enzima β -Galactosidase Imobilizada.....	102
4.5.1	Atividade em Função do pH e da Temperatura	102
4.5.2	Estabilidade Térmica da Enzima β -Galactosidase Imobilizada.....	103
4.6	Reação Pós-Imobilização.....	105
4.7	Tempo de Meia-Vida da Enzima β -Galactosidase Imobilizada	106
4.8	Quantificação dos Grupos Aldeídos	107
4.9	Adsorção de Nitrogênio	107
4.10	Hidrólise da Lactose em Reator Batelada	109
4.11	Estabilidade Operacional da Enzima β -Galactosidase Imobilizada.....	110
4.12	Síntese de Galacto-oligossacarídeos em Reator Batelada.....	112
4.12.1	Produção de Galacto-oligossacarídeos: Tampão de formulação Especial, Fosfato e Acetato	112
4.12.2	Produção de Galacto-oligossacarídeos: 90, 180 e 240 U/g de lactose 114	
4.12.3	Produção de Galacto-oligossacarídeos (40, 45 e 50°C)	117
4.12.4	Produção de Galacto-oligossacarídeos: 30, 40 e 50 % de lactose....	120
4.13	Síntese de Galacto-oligossacarídeos em Reator Batelada Alimentada ...	123
4.14	Síntese de Galacto-oligossacarídeos em Reator Contínuo (CSTR).....	125
4.15	Considerações Finais	128
5.	CAPÍTULO V - CONCLUSÕES	129
6.	CAPÍTULO VI - SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	131
7.	CAPÍTULO VII - REFERÊNCIAS	132

8. CAPÍTULO VIII - ANEXO	164
8.1 Gráficos e Equações da Influência do pH e da Temperatura na Atividade da Enzima Solúvel.....	164
8.2 Gráficos do ensaio de estabilidade térmica para a enzima solúvel (lactose 5 % (m/v) e pH 6,5)	169
8.3 Gráficos e Equações da Influência do pH e da Temperatura na Atividade da Enzima Imobilizada.....	178
8.4 Gráficos do Ensaio de Estabilidade Térmica para a Enzima Imobilizada (lactose 5 % (m/v) em soro de leite e pH 6,5)	183
8.5 Curvas de Evolução da Atividade Residual em Função do Tempo de Incubação (para o Cálculo de K_d)	193

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 - Mapa de intolerância à lactose no mundo.....	6
Figura 2.2 - Mecanismo de hidrólise e absorção da lactose no organismo de indivíduos que possuem ou não intolerância: (a) digestão normal da lactose e (b) digestão quando há deficiência de lactose.....	7
Figura 2.3 - Estrutura química dos isômeros da lactose.....	17
Figura 2.4 - Estruturas da lactose, galactose e glicose.	19
Figura 2.5 - Processo de hidrólise da lactose.	20
Figura 2.6 - Fluxograma do processo de fabricação do leite sem lactose: (a) hidrólise química (ácido), (b) enzimática (método 1) e (c) enzimática (método 2).	21
Figura 2.7 - Representação da superfície do tetrâmero da enzima β -galactosidase de <i>Kluyveromyces lactis</i> . Cadeia A é representada em azul, B em verde, C em vermelho e D em amarelo. As três interfaces diferentes entre os monômeros são nomeadas como Superfície 1 (A-C), Superfície 2 (A-B) e Superfície 3 (A-D).....	26
Figura 2.8 - Rotas enzimáticas da conversão da β -galactosidase.....	27
Figura 2.9 - Mecanismo de reação proposto para ação da enzima β -galactosidase sobre a lactose. LAC, lactose; GAL, galactose; GAL+, estado de transição da galactose; GLC glicose; ROH, açúcar receptor; GAL-OR, açúcar galactosil (oligossacarídeos).....	28
Figura 2.10 - Representação esquemática do processo de produção de oligossacarídeos.	33
Figura 2.11 - Exemplos de diferentes estruturas de GOS: (A) composição, (B) regioquímica, (C) grau de polimerização.....	36
Figura 2.12 - Diferentes princípios de imobilização enzimática.	47
Figura 2.13 - Efeito da imobilização na estabilidade da enzima.	50
Figura 2.14 - Esquema da superfície da sílica: (a) silanóis geminais, (b) vicinais, (c) isolados e (d) siloxanos	54
Figura 3.1 - Diagrama da sequência de procedimentos realizados neste trabalho.....	70
Figura 3.3 - Esquema da reação que ocorre durante a modificação química da sílica	78
Figura 3.4 – Esquema do reator batelada alimentada.....	89
Figura 3.5 – Esquema do reator contínuo	90
Figura 3.6 – Perfil cromatográfico do substrato (tempo zero de reação), ensaio em reator batelada a 40 % de lactose (m/v) em soro de leite, 40 °C e pH 6,5.....	91
Figura 3.7 – Perfil cromatográfico de uma amostra (1,75 h de reação), ensaio em reator batelada a 40 % de lactose (m/v) em soro de leite, 40 °C e pH 6,5.....	92
Figura 4.1 - Reta ajustada para a dosagem de glicose pelo método GOD-PAD.	93

Figura 4.2 - Reta ajustada para a dosagem de proteína pelo método azul de Comassie.	94
Figura 4.3 - Atividade específica da enzima β -galactosidase solúvel em função do pH e da temperatura.	96
Figura 4.4 - Estabilidade térmica da enzima β -galactosidase solúvel.....	98
Figura 4.5 - Carregamento de proteína na imobilização da enzima β -galactosidase em sílica (\blacktriangle) e Fator de efetividade (relação entre a atividade aparente e a atividade oferecida) (\bullet). Condições de imobilização: 1,0 % GPTMS, silanização a 60 °C, $\text{IO}_4 = 0,03 \text{ M}$, 20 °C, 48 h de reação, 1 mL de enzima, pH 7.0	99
Figura 4.6 - Atividade específica da enzima β -galactosidase imobilizada em função do pH e da temperatura.	103
Figura 4.7 - Estabilidade térmica da enzima β -galactosidase imobilizada.	104
Figura 4.8 - Estabilidade térmica a 45 °C da enzima β -galactosidase imobilizada sob diferentes concentrações de glutaraldeído na reticulação.....	106
Figura 4.9 - Características da sílica macroporosa, análise de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV): (a) antes e (b) depois ser submetida à silanização.....	108
Figura 4.10 - Concentração de glicose durante a reação de hidrólise. Condições de reação: 40 °C, 0,5 % (m/v) de lactose em soro de leite, pH 6,5 e 50 U/g de lactose.....	109
Figura 4.11 - Curva de conversão de lactose para o biocatalisador imobilizado com reticulação. Condições de reação: 40 °C, 0,5 % (m/v) de lactose em soro de leite, pH 6,5 e 50 U/g de lactose.....	110
Figura 4.12 - Estabilidade operacional da enzima β -galactosidase imobilizada pelo método covalente, sem reticulação. Condições de reação: 40 °C, 5 % (m/v) de lactose em soro de leite, pH 6,5 e 50 U/g de lactose.	111
Figura 4.13 - Estabilidade operacional da enzima β -galactosidase imobilizada pelo método covalente, utilizando 1% de glutaraldeído na reticulação. Condições de reação: 40 °C, 5 % (m/v) de lactose em soro de leite, pH 6,5 e 50 U/g de lactose.	112
Figura 4.14 - Gráficos de produção de galacto-oligossacarídeos usando diferentes tipos de tampões, síntese em reator batelada: 40 °C, solução de 40 % (m/v) de lactose em soro de leite, pH 6,5 e 180 U/g de lactose. (\blacktriangle) Lactose, (\blacksquare) glicose, (\square) galactose, (\circ) GOS1 e (\bullet) GOS2.	113
Figura 4.15 - Gráficos de produção de galacto-oligossacarídeos utilizando diferentes concentrações de biocatalisador imobilizado, síntese em reator batelada: 40 °C, 40 % (m/v) de lactose em soro de leite, tampão de formulação especial e pH 6,5. (\blacktriangle) Lactose, (\blacksquare) glicose, (\square) galactose, (\circ) GOS1 e (\bullet) GOS2.	115
Figura 4.16 - Gráfico de rendimento de GOS em função do tempo utilizando diferentes concentrações de biocatalisador imobilizado, síntese em reator batelada: 40 °C, 40 % (m/v) de lactose em soro de leite, tampão de formulação especial e pH 6,5.....	116

Figura 4.17 - Gráfico de conversão de lactose em função do tempo utilizando diferentes concentrações de biocatalisador imobilizado, síntese em reator batelada: 40 °C, 40 % (m/v) de lactose em soro de leite, tampão de formulação especial e pH 6,5.....	117
Figura 8.1 - Concentração da glicose em função do tempo de reação em solução de lactose 5 % (m/v) em soro de leite e pH 6,0, a diferentes temperaturas.....	165
Figura 8.2 - Concentração da glicose em função do tempo de reação em solução de lactose 5 % (m/v) em soro de leite e pH 6,5, a diferentes temperaturas.....	166
Figura 8.3 - Concentração da glicose em função do tempo de reação em solução de lactose 5 % (m/v) em soro de leite e pH 7,0, a diferentes temperaturas.....	167
Figura 8.4 - Concentração da glicose em função do tempo de reação em solução de lactose 5 % (m/v) em soro de leite e pH 7,5, a diferentes temperaturas.....	168
Figura 8.5 - Concentração da glicose em função do tempo de reação em solução de lactose 5 % (m/v) em soro de leite na temperatura de 30°C.	170
Figura 8.6 - Concentração da glicose em função do tempo de reação em solução de lactose 5 % (m/v) em soro de leite na temperatura de 35°C.	172
Figura 8.7 - Concentração da glicose em função do tempo de reação em solução de lactose 5 % (m/v) em soro de leite na temperatura de 40°C.	174
Figura 8.8 - Concentração da glicose em função do tempo de reação em solução de lactose 5 % (m/v) em soro de leite na temperatura de 45°C.	176
Figura 8.9 - Concentração da glicose em função do tempo de reação em solução de lactose 5 % (m/v) em soro de leite na temperatura de 50°C.	178
Figura 8.10 - Concentração da glicose em função do tempo de reação em solução de lactose 5 % (m/v) em soro de leite e pH 6,0; a diferentes temperaturas.....	179
Figura 8.11 - Concentração da glicose em função do tempo de reação em solução de lactose 5 % (m/v) em soro de leite e pH 6,5; a diferentes temperaturas.....	180
Figura 8.12 - Concentração da glicose em função do tempo de reação em solução de lactose 5 % (m/v) em soro de leite e pH 7,0; a diferentes temperaturas.....	181
Figura 8.13 - Concentração da glicose em função do tempo de reação em solução de lactose 5 % (m/v) em soro de leite e pH 7,5; a diferentes temperaturas.....	182
Figura 8.14 - Concentração da glicose em função do tempo de reação em solução de lactose 5 % (m/v) em soro de leite na temperatura de 30°C.	184
Figura 8.15 - Concentração da glicose em função do tempo de reação em solução de lactose 5 % (m/v) em soro de leite na temperatura de 35°C.	186
Figura 8.16 - Concentração da glicose em função do tempo de reação em solução de lactose 5 % (m/v) em soro de leite na temperatura de 40°C.	188
Figura 8.17 - Concentração da glicose em função do tempo de reação em solução de lactose 5 % (m/v) em soro de leite na temperatura de 45°C.	190

Figura 8.18 - Concentração da glicose em função do tempo de reação em solução de lactose 5 % (m/v) em soro de leite na temperatura de 50°C.	192
Figura 8.19 - Evolução da atividade residual da enzima β -galactosidase solúvel em função do tempo de incubação em diferentes temperaturas.	193
Figura 8.20 - Evolução da atividade residual da enzima β -galactosidase imobilizada sem reticulação com glutaraldeído em função do tempo de incubação em diferentes temperaturas.	193
Figura 8.21 - Evolução da atividade residual da enzima β -galactosidase imobilizada com reticulação com glutaraldeído em função do tempo de incubação em diferentes temperaturas.	194

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 - Composição típica do soro doce e ácido.....	12
Tabela 2.2 - Poder adoçante relativo e solubilidade de alguns dissacarídeos e monossacarídeos.	16
Tabela 2.3 - Características da enzima β -galactosidase de fungos, bactérias e leveduras	24
Tabela 2.4 - Preparações enzimáticas comerciais contendo β -galactosidasas.....	30
Tabela 2.5 - Galacto-oligosacarídeos disponíveis comercialmente.	38
Tabela 2.6 - Condições para formação de GOS a partir de β -galactosidase de leveduras, bactérias e fungos.	41
Tabela 3.1 - Caracterização química do soro de leite em pó.....	71
Tabela 3.2 - Composição da solução tampão de formulação especial.....	71
Tabela 4.1 - Resultados da atividade específica da enzima β -galactosidase solúvel em função do pH e da temperatura.	95
Tabela 4.2 - Resultados de estabilidade térmica da enzima β -galactosidase solúvel, valores da atividade específica em função da temperatura.....	97
Tabela 4.3 - Resultados de imobilização da enzima β -galactosidase, sob diferentes condições.	100
Tabela 4.4 - Resultados de atividade específica da enzima β -galactosidase imobilizada em função do pH e da temperatura.	102
Tabela 4.5 - Resultados de estabilidade térmica da enzima β -galactosidase imobilizada, valores da atividade específica em função da temperatura.....	104
Tabela 4.6 - Resultados de atividade específica da enzima β -galactosidase imobilizada em função da quantidade de reticulante utilizado na reação pós-imobilização	105
Tabela 4.7 - Coeficiente de desnaturalização Térmica e tempo de meia-vida d enzima β -galactosidase imobilizada - solução de lactose 5 % (m/v) em soro de leite, 45 °C e pH 6,5	107
Tabela 4.8 - Relação entre o número de grupos aldeídos oferecidos e formaos para as diferentes concentrações de glutaraldeído utilizado na reação pós-imobilização.....	107
Tabela 4.9 - Resultados de adsorção de N ₂ das amostras de sílica modificadas com diferentes concentrações de GPTMS.	108

1. CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO

O leite é um fluido composto por água, minerais em forma de solução iônica, lactose, albumina, caseína, fosfatos e gordura, constituindo uma emulsão, de forma que a gordura e a água estão estabilizadas por uma dispersão de proteínas em uma solução de sais, vitaminas, peptídeos e outros componentes menores. (VUORISALO *et al.*, 2012).

O leite não é apenas um componente básico da nutrição humana, mas também a matéria-prima para um número cada vez maior de produtos lácteos. É também uma rica fonte de valiosos compostos que são usados principalmente em alimentos, mas também em aplicações não alimentares (ILLANES *et al.*, 2016).

O soro do leite é um subproduto resultante da fabricação de queijos pela fermentação do leite através de ação bacteriana ou ainda pela ação de agentes coagulantes. Na produção de queijos, a obtenção de soro de leite pode chegar de 80 % a 90 % do volume de leite utilizado (PEREIRA, 2012). Mais da metade dos sólidos presentes no leite são constituintes do soro, incluindo grande parte da lactose, proteínas do soro, sais minerais e vitaminas solúveis (ATRA *et al.*, 2005), o que torna este subproduto grande fonte de nutrientes.

Entretanto, de acordo com Lule *et al.* (2016), cerca de 70 % da população mundial adulta apresenta intolerância à lactose. Esta é causada pela deficiência da enzima β -galactosidase em humanos podendo levar a um desconforto gastrointestinal ao consumir produtos que contêm lactose, com isso, produtos lácteos têm sido evitados na dieta de muitos. Para atender as necessidades dos consumidores que apresentam essa condição de intolerância, aliado à importância do valor nutricional dos produtos lácteos, fomentou-se a fabricação de produtos sem lactose ou com baixo teor de lactose (RONG *et al.*, 2011; BAILEY *et al.*, 2013; TROISE *et al.*, 2016).

A enzima β -galactosidase, comumente denominada de lactase, é amplamente utilizada na hidrólise da lactose em seus monossacarídeos constituintes, glicose e galactose. A atividade hidrolítica dessa enzima é aplicada na indústria de alimentos, para reduzir o teor de lactose dos produtos lácteos e para melhorar as características sensoriais dos produtos, como doçura, sabor e solubilidade. Também pode ser aplicada no processamento de produtos utilizados por indivíduos intolerantes a lactose (ANSARI e HUSAIN, 2012; SILVÉRIO *et al.*, 2018).

Enzimas são moléculas presentes nos organismos vivos com função de catalisar as reações biológicas (NELSON e COX, 2013). Diante de sua versatilidade, especificidade e eficiência nesses processos, observou-se a possibilidade de aplicá-las em produções industriais como alternativa à catálise química (CHOI *et al.*, 2015). Somente em 2016, o mercado global de enzimas de natureza proteica atingiu mais de US\$ 5 bilhões (GLOBAL

MARKET INSIGHTS, 2017). Analistas preveem que esse setor continue em crescimento nos próximos anos, atingindo um valor global de US\$ 6,3 bilhões até 2021 (DEWAN, 2017). Estima-se que 70 % desse mercado seja dominado somente por enzimas denominadas de carboidrases e proteases (GLOBAL MARKET INSIGHTS, 2017).

Para uma ampla aplicação, a possibilidade de reuso das enzimas se torna mandatório, por restrições econômicas relacionadas ao seu processo de obtenção (DATTA *et al.*, 2013). A dificuldade em se recuperar a enzima do meio reacional ao final da catálise, aliada à instabilidade e frequente inadequabilidade para uso em determinados solventes e/ou condições de pH, temperatura e exposição a agentes desnaturantes podem ser superadas por meio da imobilização (MENDES *et al.*, 2011).

Além de realizar a hidrólise de produtos lácteos, as β -galactosidases podem catalisar reações de transgalactosilação, através da transferência de uma unidade de galactose para outro carboidrato. Essa reação é aplicada na síntese de prebióticos, como os galacto-oligossacarídeos (GOS). Os principais microrganismos que sintetizam os GOS são do gênero *Aspergillus* ou *Kluyveromyces* (OTIENO, 2010; TORRES *et al.*, 2010; FISCHER e KLEINSCHMIDT, 2018).

Os prebióticos são compostos alimentares não digeríveis que possuem ação no intestino, estimulando o crescimento ou a atividade de bactérias benéficas do sistema digestivo. Esses compostos podem ser utilizados em uma ampla variedade de produtos alimentícios, como produtos de panificação, adoçantes e iogurtes. Os GOS estimulam o crescimento de bactérias intestinais benéficas, aumentando seletivamente a microflora do intestino. Os prebióticos atuam como fonte de energia e de crescimento de bifidobactérias e lactobacilos, fornecendo resistência contra a colonização de patógenos e reduzindo as infecções intestinais exógenas e endógenas. Os GOS são componentes ideais para formular produtos saudáveis direcionados a grupos específicos, como bebês, crianças e idosos (OTIENO, 2010; SANGWAN *et al.*, 2011; CHEN e GÄNZLE, 2017).

Os produtos lácteos contendo lactose são os principais substratos utilizados para a síntese de GOS a partir da hidrólise enzimática (FISCHER e KLEINSCHMIDT, 2018; OTIENO, 2010). O uso de resíduos agroindustriais, como substratos de baixo custo, pode resultar em benefícios ambientais e econômicos. Esses substratos contêm quantidades expressivas de compostos orgânicos que podem ser utilizados substituindo fontes de carbono, nitrogênio e micronutrientes.

Os galacto-oligossacarídeos (GOS) podem ser produzidos a partir da lactose, por meio de uma reação enzimática com o uso da β -galactosidase, conhecida como transgalactosilação (CHEN *et al.*, 2002). Os produtos (açúcares) obtidos desta reação são os galacto-oligossacarídeos, glicose e galactose (ALMEIDA e PASTORE, 2004), podendo-

se conseguir, dessa forma, a obtenção de produtos de alto valor agregado a partir do soro de leite ou outro substrato que contenha a lactose.

A síntese química de GOS também é possível, mas requer muitas etapas de reação devido à necessária proteção seletiva dos grupos hidroxila, o que não é o caso da síntese enzimática. Além disso, o impacto ambiental dos reagentes tóxicos seria muito maior com a síntese enzimática (HANSSON *et al.*, 2001). Portanto, o processo enzimático é mais viável, mais ambientalmente útil e menos dispendioso do que o processo químico.

Diversos autores estudaram a correlação na transgalactosilação entre a concentração inicial de lactose e a fonte da enzima. Poucos trabalhos apresentam uma síntese de GOS com mais de 40 % de rendimento (TOMAL *et al.*, 2010). A maioria das sínteses apresenta produção de GOS entre 20 e 25 %.

Sendo assim, torna-se importante realizar o estudo que possibilite a reação de produção de GOS, mantendo a concentração de lactose controlada durante a reação. Outra importante ferramenta utilizada neste trabalho será a imobilização covalente da enzima β -galactosidase em sílica macroporosa. Esta forma de utilização de enzimas pode ser atrativa para o setor industrial, tendo em vista que é necessário obter biocatalisadores ativos e termicamente estáveis para que a aplicação de enzimas neste setor seja viável (LÓPES-GALLEGO *et al.*, 2005).

Dentro deste contexto, este trabalho tem como objetivo principal o estudo da síntese de galacto-oligossacarídeos (GOS) a partir do soro de leite, por meio da reação de transgalactolisação com a enzima β -galactosidase comercial *Kluyveromyces lactis*, imobilizada em sílica macroporosa. Esta reação foi estudada sob diferentes condições de meio, temperatura, concentração de lactose, quantidade de enzima e tipo de reator.

Objetivou-se, inicialmente, atingir a meta de obtenção de enzimas imobilizadas e estabilizadas, utilizando-se a técnica de imobilização covalente ao suporte, com posterior reticulação. O estabelecimento destas ligações torna a molécula de enzima muito mais rígida e, por conseguinte, muito mais resistente a mudanças conformacionais induzidas por aquecimento, solventes orgânicos e outros agentes desnaturantes, o que possibilitou a realização da reação de transgalactosilação em condições mais brandas. Os derivados obtidos foram caracterizados quanto à retenção de atividade, estabilidade térmica e eficiência na hidrólise da lactose. Esse estudo envolveu a caracterização para a enzima solúvel e imobilizada quanto a atividade enzimática, atividade específica em função do pH e estabilidade térmica.

Tem sido amplamente demonstrado que o rendimento da reação é altamente dependente da concentração de lactose. Torres *et al.*, (2010) mostraram que, as reações de hidrólise, independentemente da fonte de enzima, são predominantes em concentrações de lactose abaixo de 30 % (m/v), correspondendo a aproximadamente 37 g

de lactose por 100 g de água. A alta concentração requerida do substrato é um dos principais desafios na síntese de GOS, devido à baixa solubilidade da lactose que é de aproximadamente 33,5 g de lactose por 100 g de água a 40 °C (WALSTRA *et al.*, 2006).

Nesse contexto, outro objetivo deste trabalho foi o estudo da reação de transgalactosilação em reatores batelada alimentada e CSTR, visando avaliar o potencial dessas duas estratégias para o aumento da concentração do substrato nas reações e, conseqüentemente, o rendimento de GOS, e compará-las com a síntese em batelada.

2. CAPÍTULO II – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo são abordados os temas necessários à fundamentação do trabalho de pesquisa.

2.1 Produção, Consumo de Leite e o Problema de Intolerância à Lactose

De acordo com o IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística), a atividade leiteira no Brasil teve aumento gradativo entre os anos de 2006 e 2015, com aumento de 38 % da produção. Porém, a partir do ano de 2017, a produção apresentou um decréscimo de cerca de 0,5 % devido a fatores diversos, como: condições climáticas, aumento dos preços dos insumos e aumento da importação de lácteos, levando à estagnação da cadeia produtiva (SEAB, 2017). No ano de 2018, a produção de leite sob inspeção no Brasil fechou com crescimento próximo de 0 % (EMBRAPA, 2018) em função das condições econômicas do país.

Apesar desta queda, o estado do Paraná, que antes ocupava o terceiro lugar no ranking de produção, a partir de 2015 passou a ocupar o segundo lugar, com 4,66 bilhões de litros produzidos, produção inferior somente a do estado de Minas Gerais, com 9,14 bilhões de litros (SEAB, 2017).

Porém, especialistas estimam um crescimento um pouco mais robusto na demanda de lácteos para o ano de 2019. Para atender à demanda por produtos lácteos em 2030, o setor deverá aumentar a produção em 304 milhões de toneladas por ano. Isso equivale a três vezes a produção leiteira dos Estados Unidos, atualmente (ABIQ, 2019).

Embora a produção e consumo de leite e produtos lácteos seja crescente, é grande o número de pessoas que não podem consumir estes produtos por apresentarem intolerância à lactose presente nos produtos lácteos.

A intolerância ou má digestão da lactose consiste na redução da capacidade de hidrolisar a lactose, em virtude da hipolactasia, termo que define a redução da atividade enzimática da β -galactosidase (ou lactase), presente na mucosa intestinal (MATTAR *et al.*, 2012).

Acredita-se que esta condição afeta mais de 75 % da população mundial. Aproximadamente 5 % das ocorrências estão no norte da Europa, enquanto mais de 90 % estão localizadas em alguns países da Ásia e da África (Figura 2.1). No Brasil, a intolerância à lactose afeta de 20 a 25 % da população. Estudos mostram prevalências de 8 a 45 % nas regiões Sudeste e Sul, com aumento significativo na região Nordeste, 75 %. Estes dados são explicados pelo fato de a raça negra normalmente apresentar, com o passar da idade, uma menor produção de β -galactosidase do que a raça branca

(SPARVOLI, 1989; PRETTO *et al.*, 2002; FRYE, 2002; PEREIRA e FURLAN, 2004; JELLEMA *et al.*, 2010).

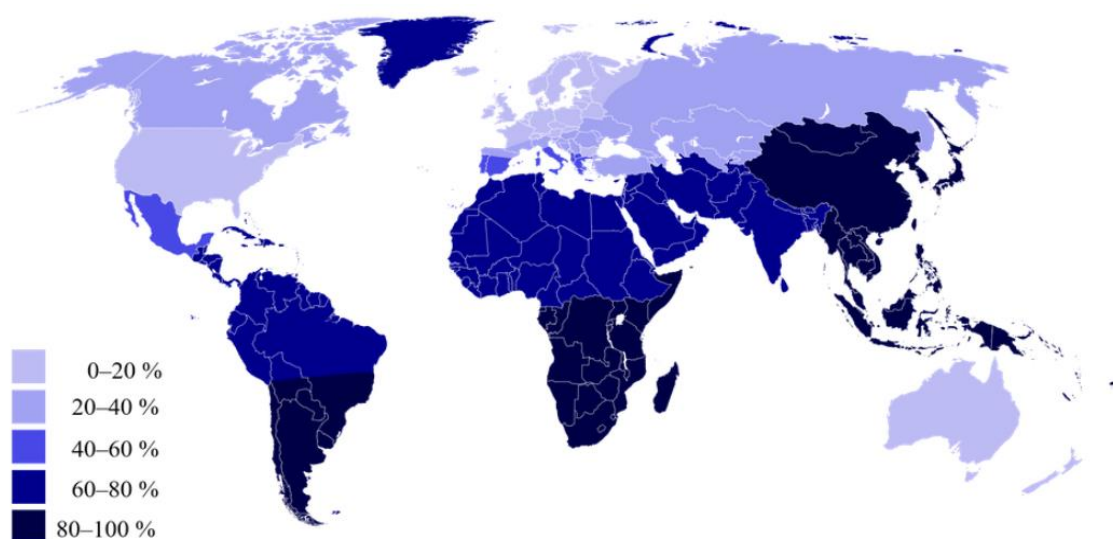


Figura 2.1 - Mapa da intolerância à lactose no mundo.

Fonte: Reddit 2018.

A condição de má digestão pode ser assintomática, sendo a intolerância diagnosticada quando os sintomas estão presentes (JULLEMA *et al.*, 2010; MATTAR *et al.*, 2012). O mecanismo de absorção, hidrólise e presença dos sintomas em indivíduos com intolerância encontra-se apresentado na Figura 2.2.

Na mucosa, esta enzima está presente nas pontas das vilosidades, sendo sua atividade originária β -galactosidase, encontrada dentro da mucosa intestinal (STRZALKOWSKA *et al.*, 2018). A absorção de lactose ocorre devido à hidrólise de lactose em glicose e galactose nos enterócitos intestinais. Os monossacarídeos de glicose e galactose são assimilados na corrente sanguínea. A absorção de glicose inicialmente é usada como base vital e energia, enquanto a galactose como um componente glicolipídico e glicoproteico (NIVETHA e MOHANASRINIVASAN, 2017).

A lactose não absorvida permanece no intestino grosso, levando a um aumento da carga osmótica nos fluidos e eletrólitos do lúmen. Portanto, as bactérias intestinais utilizam a lactose como substrato para o seu crescimento, levando a sintomas como flatulência, em virtude da produção de ácidos graxos voláteis e gases, pelo metabolismo bacteriano, além de dores, distensão abdominal e diarreia (DE VRESE *et al.*, 2001; HEYMAN, 2006; JELLEMA *et al.*, 2010; LEVITT *et al.*, 2013; MISSELTWITZ *et al.*, 2013; NIVETHA e MOHANASRINIVASAN, 2017).

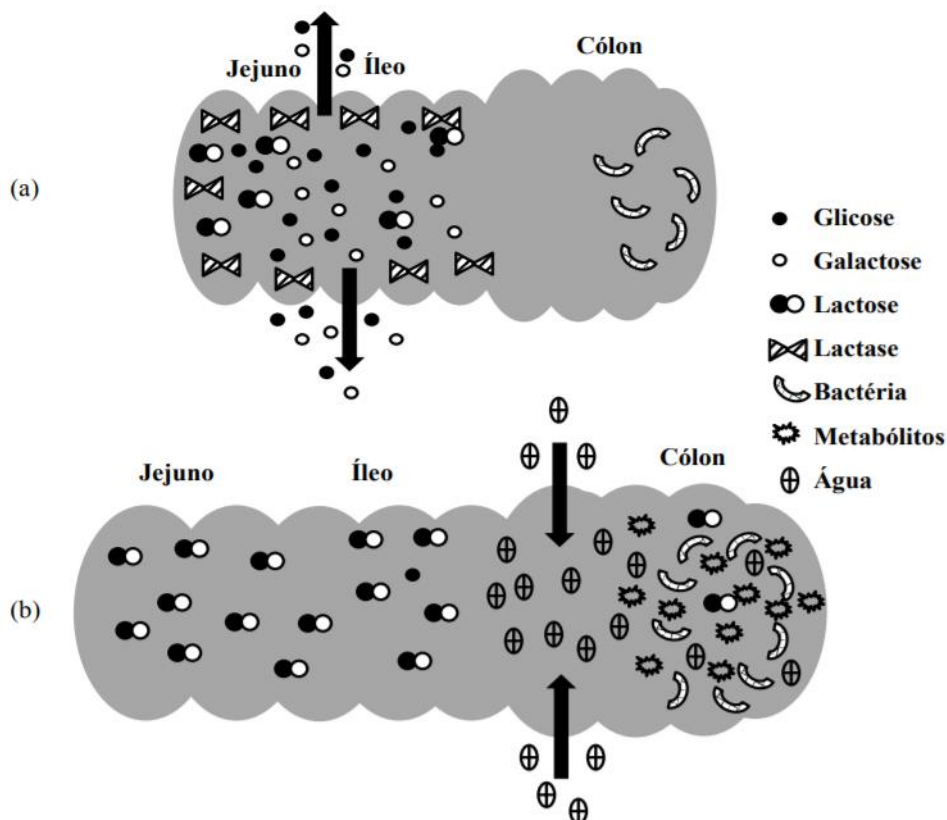


Figura 2.2 - Mecanismo de hidrólise e absorção da lactose no organismo de indivíduos que possuem ou não intolerância: (a) digestão normal da lactose e (b) digestão quando há deficiência da lactase.

Fonte: Adaptado de Ustok (2007) e Corgneau *et al.*, (2015).

A deficiência da β -galactosidase é geralmente diagnosticada com base em história de sintomas gastrointestinais, que ocorrem após a ingestão do leite, por teste para níveis anormais de hidrogênio na respiração (a fermentação da lactose digerida resulta na produção de hidrogênio), ou na medição da atividade dissacaridásica da mucosa intestinal por intubação intestinal (LOMER *et al.*, 2008).

Existem quatro classes de intolerância à lactose (IL), decorrentes de diferentes processos: deficiência congênita da enzima; deficiência primária ou ontogenética e deficiência secundária ou diminuição enzimática secundária oriunda de doenças intestinais (ZYCHAR e OLIVEIRA, 2017):

- a) Deficiência primária de lactase ou hipolactasia adulta é a mais frequente delas. O termo hipolactasia significa diminuição na ação da enzima lactase na mucosa do intestino e é caracterizada por alterações nos genes codificadores de lactase devido a fatores hereditários (GASPARIN *et al.*, 2010; ZYCHAR e OLIVEIRA, 2017). Na literatura também encontramos a hipolactasia adulta, classificada como

congenita e adquirida. Esta última podendo ser classificada em primária e secundária. A hipolactasia adquirida primária ou não persistência à lactose, se trata da perda programada da atividade de lactase, sendo considerada fisiológica, visto que após o desmame, fisiologicamente a atividade da lactase diminui na maioria das populações (SHILS *et al.*, 2009; MATTAR *et al.*, 2012; ZYCHAR e OLIVEIRA, 2017).

- b) Hipolactasia adquirida secundária ou deficiência secundária da lactase pode ocorrer em decorrência de doenças que afetam a borda da mucosa do intestino, enterite regional, infecção por *Ascaris lumbricoides*, diarreia infecciosa, intestino curto, sendo esta transitória e reversível mediante tratamento (SHILS *et al.*, 2009; GASPARIN *et al.*, 2010; ZYCHAR e OLIVEIRA, 2017).
- c) Intolerância congênita, a literatura apresenta diversas descrições para este caso, sendo caracterizada por alguns autores como deficiência congênita da lactase e por outros como deficiência congênita da lactose (SHILS *et al.*, 2009; GASPARIN *et al.*, 2010; ZYCHAR e OLIVEIRA, 2017). Na intolerância congênita de lactase, ela é conhecida como herança autossômica recessiva e passada de geração em geração, o recém-nascido não apresenta atividade da enzima lactase, esta está ausente no momento do nascimento, fator incomum visto que, neonatos de forma geral tem alta atividade de lactase. Já a intolerância congênita à lactose não está relacionada a uma deficiência enzimática e sim a uma falha na absorção gástrica, podendo ser fatal na primeira infância e tornando esta, uma discussão controversa sobre o real mecanismo deste tipo de intolerância (SHILS *et al.*, 2009; GASPARIN *et al.*, 2010; MATTAR *et al.*, 2012; ZYCHAR e OLIVEIRA, 2017).
- d) Intolerância ontogenética à lactose, caracterizada pela má absorção da lactose, é o tipo de manifestação mais comum, podendo manifestar durante a infância ou vida adulta (GASPARIN *et al.*, 2010; MATTAR *et al.*, 2012; ZYCHAR e OLIVEIRA, 2017). Em geral, a severidade dos sintomas provenientes deste tipo de deficiência varia de acordo com a quantidade de lactose ingerida, idade do indivíduo, genética e taxa de ingestão. Somado a estes, existem fatores psicológicos e culturais que podem também influenciar no nível de tolerância a alimentos contendo lactose.

Quanto ao tratamento, no caso de intolerância congênita à lactose, existe a necessidade de seguimento de dieta isenta de lactose. Se a deficiência enzimática for adquirida, essa forma de se alimentar não é permanente, podendo-se retornar à dieta habitual após a resolução do problema. No caso de deficiência ontogênica, como existe apenas uma diminuição da atividade enzimática, não há necessidade de excluir a lactose completamente da dieta, bastando haver uma redução da quantidade de leite e derivados, de acordo com a tolerância individual. Uma das grandes preocupações com a diminuição

da lactose na alimentação é a garantia do fornecimento de quantidade apropriada de proteínas, cálcio, riboflavina e vitamina D, que tem no leite e seus derivados a sua maior fonte (UGGIONI e FAGUNDES, 2006; BENEVIDES e VEIGAS, 2014, ZYCHAR e OLIVEIRA, 2017).

A redução ou eliminação do leite e seus derivados da dieta de crianças intolerantes à lactose pode comprometer a absorção de proteína e riboflavina, além do cálcio (VANDENPLAS, 2015; CANANI *et al.*, 2016). A lactose age como um promotor na absorção e na retenção de cálcio no intestino e absorção de magnésio e manganês (SOMMER *et al.*, 2002). Também prolonga a ação da vitamina D, em caso da redução da radiação solar, e ajuda na prevenção do raquitismo e da osteomalácia (HALL *et al.*, 2008). Portanto, é recomendada a adição de cálcio nos produtos lácteos sem lactose ou com quantidade de lactose reduzida porque a absorção desse mineral no intestino é baixa quando não se tem a presença de lactose (SECHI *et al.*, 2016).

A terapia de reposição enzimática com lactase exógena (+ β -galactosidase), obtida de leveduras ou fungos, constitui uma possível estratégia para a deficiência primária de lactose. Estes preparados comerciais de "lactase", quando adicionados a alimentos que contenham lactose ou ingeridos com refeições com lactose, são capazes de reduzir os sintomas e os valores de hidrogênio expirado em muitos indivíduos intolerantes à lactose. Entretanto, estes produtos não são capazes de hidrolisar completamente toda a lactose da dieta com resultados variáveis em cada paciente. As "lactases" exógenas estão disponíveis comercialmente na forma líquida e em cápsulas e tabletes, e possivelmente as diferentes preparações não são equivalentes. A enzima solúvel pode ser adicionada ao leite que é então refrigerado de um dia para o outro antes do uso (porém pouco prático para uso frequente). Existem também leites comerciais com baixo teor de lactose (pré-incubado com lactose já hidrolisada), porém não estão amplamente disponíveis em muitos restaurantes e lanchonetes. Apesar dos trabalhos enfatizarem a eficácia das formulações líquidas de "lactase" na melhora dos sintomas e na redução do hidrogênio expirado, a taxa real de eficácia apresenta resultados discrepantes, que decorrem do tipo de micro-organismo utilizado, da contribuição da atividade residual da lactase da mucosa intestinal, e da dose de reposição utilizada (ROSADO *et al.*, 1984; SOLOMONS *et al.*, 1985; LIN *et al.*, 1993)

No mercado encontram-se produtos lácteos com baixo teor de lactose, que são alternativas para o público que apresenta a má digestão da mesma. Dentre eles se destacam os lácteos fermentados, os queijos duros, o doce de leite com β -galactosidase e os leites com reduzido teor de lactose. Estes produtos possibilitam ao consumidor a ingestão adequada de nutrientes, minimizando os riscos de comprometimento da saúde (GASPARIN *et al.*, 2010; SAVAIANO, 2014).

Os produtos lácteos fermentados são recomendados para pessoas com má digestão da lactose porque a β -galactosidase presente nos micro-organismos utilizados na fabricação desses leites fermentados – como iogurte e coalhada – possibilita a hidrólise de parte da lactose presente nesses produtos (MORIWAC e MATIOLI, 2000; SHAUKAT *et al.*, 2010). Entre os produtos fermentados, o iogurte é o que apresenta melhor tolerância. Esta melhor tolerabilidade tem sido atribuída à alta atividade da β -galactosidase presente nos micro-organismos usados na produção do iogurte (normalmente *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* e *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus*) comparados com outras bactérias produtoras de ácido láctico. Longo (2006), em seu estudo, constatou que o iogurte com baixo teor de lactose, utilizando a β -galactosidase em seu processo de fabricação, apresenta menor grau de acidez e melhor percepção de sabor doce, rendendo ao produto característica de suavidade. A hidrólise enzimática da lactose pode aumentar em até três vezes o sabor doce, contribuindo substancialmente para a doçura do produto, reduzindo a necessidade de adição de açúcar (NARANJO *et al.*, 2013).

Os queijos duros são os mais indicados para o consumo por portadores da má digestão de lactose, visto que no processo de fabricação grande parte da lactose fica no soro, concentram-se os sólidos e parte da lactose que fica presente na massa é transformada em ácido láctico (GASPARIN *et al.*, 2010). Outro produto lácteo com baixo teor de lactose encontrado no mercado é o doce de leite com β -galactosidase presente na formulação, que reduz o teor de lactose, minimiza os problemas de arenosidade causada por sua cristalização e favorece o escurecimento devido à Reação de Maillard, melhorando as características sensoriais do produto (LONGO, 2006; CORGNEAU *et al.*, 2015).

A hidrólise da lactose é uma das principais tecnologias aplicadas para a produção de produtos lácteos com baixa lactose, ainda existem outras técnicas para a remoção da lactose do leite. O método preferencialmente utilizado hoje é a hidrólise enzimática pela adição de β -galactosidase (CORGNEAU *et al.*, 2015) A lactose pode ser hidrolisada antes do tratamento térmico ou após, se a enzima for adicionada antes do envase do produto. Ao ser adicionada ao leite, a enzima β -galactosidase efetua a quebra da molécula de lactose tal como a β -galactosidase intestinal, o que dá àqueles que possuem a deficiência desta enzima a possibilidade de usufruir dos outros nutrientes presentes no leite, como a proteína, o cálcio e a vitamina A, evitando os inconvenientes e desconfortos causados pela má absorção da lactose (TANRISEVEN e DOGAN, 2002).

De acordo com a legislação brasileira (ANVISA, 2016), para um alimento ser considerado isento de lactose, o mesmo deve conter quantidade igual ou menor que 10 mg por 100 g ou 100 mL do produto pronto para consumo e, alimentos com baixo teor de lactose devem conter quantidades maiores que 10 mg mas menores ou iguais a 1 g por 100 mL ou 100 g do produto pronto para o consumo (ANVISA, 2016).

Portanto, a busca por novas tecnologias visando à elaboração de alimentos ou preparações enzimáticas que atendam às necessidades desses indivíduos intolerantes à lactose é de suma importância.

2.2 Soro de Leite

O soro de leite (ou soro lácteo) é coproduto da indústria de laticínios, definido como a fração aquosa do leite que é separada da caseína durante a produção de queijos (CAMARGO *et al.*, 2000). Contém cerca de 55 % dos sólidos existentes no leite integral original e apresenta cerca de 80 a 90 % do volume de leite utilizado na fabricação de queijo (ANDRADE e MARTINS, 2002). O Brasil é o sexto maior produtor mundial de queijos. Em média, 10 L de leite são necessários para a produção de 1 kg de queijo, resultando em um subproduto de 8 a 9 L de soro de leite. Isso equivale a 5 milhões de toneladas de soro de leite produzidas anualmente (SOUZA *et al.*, 2010).

No passado, o soro de leite não era aproveitado: ou era utilizado para alimentação animal ou para a confecção de poucos produtos como, por exemplo, a ricota. Porém, com o conhecimento da qualidade nutricional de seus componentes (proteínas, lactose, etc.) e o desenvolvimento de técnicas de fracionamento, o soro passou a ser considerado um ingrediente de grande valor para a indústria alimentícia e farmacêutica, podendo ser aproveitado para obtenção de diversos produtos, tais como: bebidas lácteas, soro em pó, isolados e concentrados proteicos, entre outros (TEIXEIRA *et al.*, 2013).

A composição do soro de leite é, em média, 93 % de água, 5 % de lactose, 0,7 a 0,9 % de proteínas, 0,3 a 0,5 % de gordura, 0,2 % de ácido láctico e pequenas quantidades de vitaminas (OLIVEIRA *et al.*, 2012). As proteínas do soro de leite são reconhecidas como um valioso ingrediente alimentar com importantes propriedades nutricionais e funcionais (CORZO-MARTINEZ *et al.*, 2015). Segundo Gajo *et al.*, 2016 o valor nutricional do soro deve-se a aminoácidos essenciais, proteínas de alto valor do complexo β -lactoferrina, β -lacto globulina, α -lactoalbumina, glicomacropéptídeos, imunoglobulinas e minerais importantes, como o cálcio.

Dos componentes presentes no soro, as proteínas e a lactose são as mais importantes em termos de aplicação (GIROTO e PAWLOWSKY, 2001; NUNES e SANTOS, 2015). A lactose é muito usada como material energético para vários processos biotecnológicos, principalmente na indústria farmacêutica e também na indústria alimentícia, por ser um carboidrato de baixo poder adoçante (NUNES e SANTOS, 2015).

Do ponto de vista industrial, o soro de leite pode ser classificado em dois tipos, de acordo com a forma de remoção da caseína. Se a remoção da caseína presente no soro é feita pela adição de ácido (pH 4,6) o soro é denominado soro ácido. Por outro lado, se a

caseína for removida pela ação da renina tem-se o soro doce, que contém, em geral, maior quantidade de pequenos peptídeos e aminoácidos livres, que são resultantes da ação da renina sobre as caseínas (DULLIUS *et al.*, 2018). Segundo Brandelli *et al.*, (2015) o soro de leite também pode ser obtido pelo processo de separação física das micelas de caseína por microfiltração, obtendo-se um concentrado de micelas e proteínas do soro, na forma de concentrado o isolado proteico.

A composição química do soro depende da composição química do leite, que varia de acordo com a alimentação, reprodução, diferença individual do animal e do clima (DULLIUS *et al.*, 2018). Além disso, a composição e o tipo de soro produzido na indústria leiteira variam em função dos processos tecnológicos empregados, do leite utilizado e do tipo de queijo fabricado (TEIXEIRA e FONSECA, 2008). Na Tabela 2.1 é apresentada uma comparação entre as composições do leite integral, leite desnatado, soro doce e soro ácido.

Tabela 2.1 - Composição típica do soro doce e ácido.

Componente (%)	Leite Integral	Leite Desnatado	Soro Doce (pH 6,7)	Soro Ácido (pH 4,6)
Umidade	84,7	90,4	93,7	93,5
Lactose	4,8	5,1	4,9	4,9
Gordura	3,5	0,1	0,5	0,04
Proteína	3,5	3,6	0,8	0,7
Cinzas	0,7	0,7	0,5	0,8

Fonte: Adaptado de Alves *et al.*, 2014.

No Brasil, a produção é constituída quase que exclusivamente de soro doce, oriundo da fabricação de queijos por coagulação enzimática (mussarela, prato, minas frescal, meia cura e outros), que são os mais comercializados no país (PABOUEF *et al.*, 2012). Já o soro ácido, proveniente da produção de queijos de coagulação ácida, de menor consumo (ricota e requeijão), bem como da fabricação de caseína, praticamente inexistente no país, pouco contribui no cômputo geral (PABOUEF *et al.*, 2012).

Um dos principais problemas do soro é seu alto poder poluente. A maior parte produzida é enviada à estação de tratamento de efluentes ou, muitas vezes, lançada

diretamente em rios ou sobre o solo. O soro lácteo apresenta potencial poluidor aproximadamente 100 vezes maior que o do esgoto doméstico (PORTO *et al.*, 2005). Quando o soro é lançado junto aos demais resíduos líquidos das indústrias de laticínios, isto pode significar a duplicação do sistema de tratamento, pois exibe uma alta Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO), apresentando valores de 30-50 g L⁻¹ e uma Demanda Química de Oxigênio (DQO) da ordem de 60-80 g L⁻¹. A grande responsável pela alta DBO e DQO é a lactose. A estabilização, por métodos convencionais para o tratamento biológico do soro, é dificultada pelo fato deste apresentar alta concentração de matéria orgânica e deficiência de nitrogênio (GIROTO e PAWLOWSKY, 2001; PRAZERES *et al.*, 2012).

Nas últimas décadas, a procura do soro de leite começou a aumentar devido aos benefícios que as proteínas de alta qualidade encontrada no mesmo oferecem às crianças, adultos e idosos. O aumento de aplicações farmacêuticas das frações de proteínas para o controle da pressão arterial e para indução do sono pode aumentar ainda mais o mercado (KOSSEVA *et al.*, 2009; GAJO *et al.*, 2016). Os produtos de soro apresentam a importante vantagem de possuírem propriedades funcionais, além de serem uma fonte concentrada de nutrientes lácteos, sobretudo proteínas de elevado valor nutricional e cálcio (THAMER e PENNA, 2006; PRAZERES *et al.*, 2012). O soro é geralmente utilizado devido às suas proteínas como suplemento para ração animal e, mais recentemente, devido as suas propriedades funcionais e nutricionais, em alimentos processados (MAWSON, 1994).

O soro pode ter basicamente três destinos principais. O primeiro é o seu processamento até produtos diversos, incluindo soro em pó, bebida láctea, ricota, concentrado proteico, formulações de alimentos infantis, iogurte, doce de leite, alimentos dietéticos, sopas, molhos, produtos de panificação, confeitarias, sorvetes e bebidas, molhos de carne e salsichas, entre outros (GERNIGON *et al.*, 2010). O segundo seria o seu uso na alimentação animal, podendo ser utilizado na forma líquida, condensada, seca ou como produtos de soro seco. Finalmente, o terceiro destino seria o seu tratamento para posterior despejo no esgoto (CANCINO, *et al.*, 2006; REZAEI *et al.*, 2011)

Na alimentação humana, o soro pode ser utilizado na forma líquida, condensada ou em pó, sendo que a forma em pó é geralmente preferida por apresentar maior tempo de armazenamento, podendo ser modificado e/ou misturado com outros produtos servindo a propósitos específicos (CANCINO *et al.*, 2006).

O soro pode ser utilizado de diferentes formas: soro fresco, pasteurizado ou não; soro condensado, contendo de 35 a 60 % de sólidos; soro condensado adoçado, contendo 38 % de sólidos e 38 % de açúcares; soro seco e, finalmente, pode-se utilizar os componentes individuais do soro, como a lactose e as proteínas (MATTHEUS, 1984; REZAEI *et al.*, 2011).

A quantidade de proteínas encontradas no soro corresponde a 0,7 % da sua composição média e equivale a cerca de 20 a 25 % do total de proteínas encontradas no leite (MATTHEUS, 1984; REZAEI *et al.*, 2011).

De acordo com Pacheco *et al.*, (2005), as proteínas do soro apresentam algumas vantagens em relação às caseínas. Diferenças fundamentais no metabolismo e na ação fisiológica das caseínas e das proteínas de soro de leite baseiam-se nas propriedades do soro não sofrerem alterações conformacionais pelos ácidos estomacais. Ao atingirem o estômago delgado são rapidamente digeridas e seus aminoácidos absorvidos, elevando rapidamente a concentração aminoacídica do plasma e estimulando a síntese de proteínas nos tecidos (SGARBIERI, 2004).

A extração do soro de leite na indústria de alimentos pode ser realizada através de três processos principais: coagulação enzimática das caseínas para produção de queijos e soro doce; precipitação ácida no pH isoeletrico, resultando em caseinatos e soro ácido; e separação das micelas de caseína por ultrafiltração, para obtenção de concentrados ou isolados proteicos (SGARBIERI, 2004).

A concentração do soro leva à formação de produtos proteicos que podem ser utilizados como ingredientes, para melhorar as propriedades tecno-funcionais dos alimentos (solubilidade, gelificação, viscosidade, emulsificação, formação de espuma) (BAUMAN *et al.*, 2006). Os concentrados ou isolados proteicos de soro são valiosos como ingredientes alimentares pela alta solubilidade em ampla faixa de pH. Essa propriedade permite sua aplicação, por exemplo, em bebidas para esportistas, com possibilidade de fornecimento de proteínas em quantidades similares às contidas em uma refeição diária. A capacidade de produtos de proteínas do soro de absorver água e as características de gelificação permite sua aplicação como ingredientes em produtos assados e em carne processada. Como emulsificante, os concentrados proteicos de soro encontram ampla aplicação na formulação de molhos para saladas, cremes artificiais de café, bebidas nutricionais e sopas (CANCINO *et al.*, 2006; REZAEI *et al.*, 2011).

Alguns produtos derivados de soro comercialmente disponíveis são: concentrado proteico de soro (*whey protein concentrate – WPC*) que é o produto obtido pela remoção de constituintes não proteicos do soro de forma que o produto final seco contenha, em geral, entre 35 % e 80 % de teor proteico e o isolado proteico de soro (*whey protein isolate – WPI*) que é a forma comercial mais pura das proteínas do soro e contém entre 80 e 95 % de proteína (BRANS *et al.*, 2004; REZAEI *et al.*, 2011). Os concentrados e isolados proteicos têm grande aplicação nas indústrias alimentícias pela funcionalidade

As bebidas contendo soro lácteo são hoje uma realidade no mercado brasileiro, sendo processadas de diversas formas como UHT (*ultra-high temperature*); pasteurizadas; fermentadas semelhantes ao iogurte; *soft-drinks*; carbonatadas e em diversos sabores,

como morango, chocolate, frutas cítricas, entre outros, com um mercado consumidor promissor. Dessa maneira, é crescente o número de pesquisas com bebidas contendo soro de leite (ALMEIDA *et al.*, 2001; THAMER e PENNA, 2006; ALMEIDA *et al.*, 2009; PFLANZER *et al.*, 2010).

Estudos demonstram a viabilidade da utilização do soro líquido em concentrações que variam de 30 a 70 % na produção de bebidas lácteas, com características próximas ao iogurte natural em relação à coloração e ao aroma. A viscosidade da bebida pode variar de relativamente baixa – semelhante à de uma mistura de leite e suco de frutas – até a viscosidade dos iogurtes tradicionais para beber (PENNA *et al.*, 2009).

O fracionamento do soro em lactose e proteínas permite a utilização dos constituintes de maior importância comercial presentes no soro de leite. A lactose tem várias propriedades funcionais úteis que tornam sua aplicação desejável em indústrias alimentícias e farmacêuticas (MATHUR *et al.*, 1980; PENNA *et al.*, 2009).

O permeado de soro de leite pode ser obtido a partir da remoção de proteína do soro de leite, por membranas de ultra filtração, seguido de concentração em evaporadores tubulares e posterior desidratação. O permeado pode ser utilizado em diversos produtos, tanto para alimentação humana quanto para alimentação animal, podendo ser usado em: produtos cárneos, lácteos, panificação, confeitaria, snacks, salgadinhos, sorvetes, suplemento alimentar, ração animal, fármacos, entre outros (SOORO, 2019).

O soro na forma de concentrados proteicos vem sendo aplicado pela indústria de alimentos na confecção de produtos dietéticos – nos quais age como substituinte da gordura –, em produtos de panificação, confeitaria, cárneos, sopas, molhos para salada, alimentos infantis, bebidas para atletas, dietas enterais e produtos lácteos (PENNA *et al.*, 2009).

Com o contínuo desenvolvimento de tecnologia e crescente responsabilidade ambiental por parte das indústrias, a imagem do soro está mudando depressa de efluente para uma valiosa fonte de nutrientes, que também pode ser transformada em produtos de valor agregado. A hidrólise da lactose presente no soro mostra-se como uma alternativa para a produção de derivados lácteos com baixo teor de lactose, além da possibilidade de produção de galacto-oligosacarídeos via reação de transgalactosilação.

2.3 Lactose

Conhecida como o açúcar do leite, a lactose é o principal carboidrato em sua composição, sendo que o leite contém apenas traços de outros açúcares (FOX e MCSWEENEY, 1998; WALSTRA *et al.*, 2006). É um nutriente primordial no desenvolvimento dos mamíferos, e seus teores variam entre as espécies; o leite de vaca

contém entre 4,5 a 4,8 % de lactose enquanto o leite humano possui cerca de 7 % de lactose (FOX e McSWEENEY, 1998; SHENDURSE e KHEDKAR, 2016).

A lactose consiste em um dissacarídeo composto por D-Glicose e D-Galactose unidos a partir de uma ligação β -1,4-glicosídica (WALSTRA *et al.*, 2006). Possui em sua estrutura um grupo hemiacetal livre, portanto, é considerada um açúcar redutor, e conseqüentemente está susceptível à reação de escurecimento não enzimático, denominada reação de Maillard, escurecendo o leite e conferindo-lhe um sabor cozido (FOX e McSWEENEY, 1998).

Apresenta baixa solubilidade (FENNEMA *et al.*, 2010) e menor poder adoçante em relação a outros açúcares (Tabela 2.2) como a sacarose, glicose e galactose (RODRIGUES JÚNIOR *et al.*, 2016). Mediante ação enzimática a lactose pode ser hidrolisada em glicose e galactose (FOX e McSWEENEY, 1998). Esta reação de hidrólise é realizada pela enzima β -galactosidase (WALSTRA *et al.*, 2006), conhecida popularmente como lactase (SANTIAGO *et al.*, 2004).

Tabela 2.2 - Poder adoçante relativo e solubilidade de alguns dissacarídeos e monossacarídeos.

Açúcar	Poder adoçante relativo	Solubilidade (g lactose/100 g água)		
		10°C	30°C	50°C
Sacarose	100	66	69	73
Lactose	16	13	20	30
D-galactose	32	28	36	47
D-glicose	74	40	54	70
D-frutose	173	-	82	157

Fonte: Adaptado de Zadow (1984).

É encontrada sob duas formas isoméricas cristalinas α hidratada e β anidra (Figura 2.3), diferindo somente nas posições relativas do hidrogênio e do grupo hidroxila no átomo de carbono, α é frequentemente mais usada em aplicações industriais (FOX, 1997; ORDÓÑEZ, 2005).

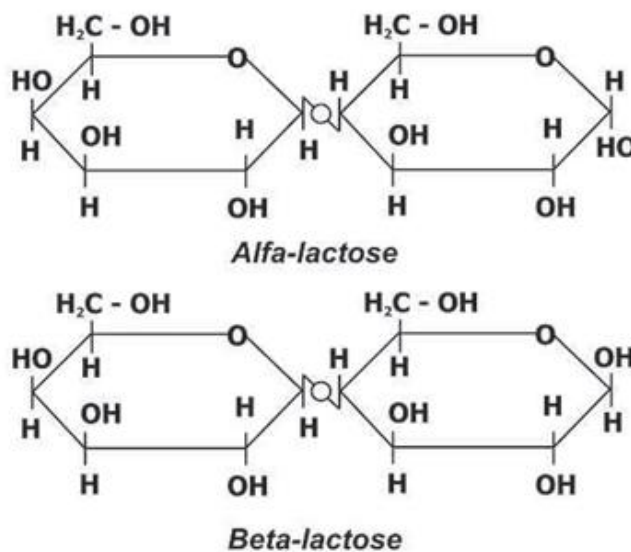


Figura 2.3 - Estrutura química dos isômeros da lactose.

Fonte: Adaptado de Longo (2006).

Conforme Fennema *et al.*, (2010), a lactose, em solução aquosa, consiste de 61,5 % de anômero β e 38,5 % de α . O equilíbrio entre ambas é estabilizado por mutarrotação, ou seja, pode ocorrer uma mudança na posição da hidroxila e do hidrogênio do grupo redutor da lactose, fazendo com que a forma α se transforme em β e vice-versa. Esta mudança na rotação e a transformação de uma forma na outra persiste até que haja o equilíbrio mutarrotacional. As formas β e α possuem características distintas, como por exemplo a solubilidade. A forma α possui “solubilidade verdadeira”, a 15 °C, de 7 g / 100 g de água, enquanto a forma β , sob as mesmas condições, apresenta solubilidade de 5 g / 100 g de água (a solubilidade média da lactose, a 20 °C, de 20 g / 100 g de água). Por isso, o fenômeno médio da mutarrotação é muito importante no processo de cristalização (FOX e McSWEENEY, 1998).

Segundo Rodrigues *et al.*, (2016), o processo de cristalização da lactose é condicionado por vários fatores, como a velocidade da mutarrotação das formas α e β , o grau de saturação da solução, pH e temperatura dos produtos lácteos. A formação de cristais de dimensões superiores a 10 micrômetros contribui para o aparecimento de uma estrutura arenosa nos produtos lácteos, causando a sua depreciação.

A lactose é uma importante fonte de energia para o organismo proporcionando 16,8 kJ g⁻¹. Ela é usada em dietas, visto que os níveis de glicemia são reduzidos quando comparados aos níveis de glicemia atingidos com o consumo de glicose. A hidrólise da lactose em monoses (glicose e galactose) aumenta este índice, sendo os monossacarídeos, mais facilmente digeríveis e solúveis (FOX e McSWEENEY, 1998; WALSTRA e JENNESS, 1984; ORDÓÑEZ, 2005; KLEIN, 2012).

Na indústria de alimentos a lactose merece destaque na fabricação de iogurtes e queijos (fermentação da lactose), e em outros alimentos não lácteos, como sopas, bebidas, produtos cárneos e misturas de especiarias. Na indústria farmacêutica, a lactose é comumente usada nas formulações como excipiente em cápsulas e comprimidos (GAMBELLI, 2017).

A lactose, um dos principais constituintes do soro, pode ser transformada enzimaticamente a galacto-oligossacarídeos (GOS), que são facilmente utilizados por bifidobactérias, contribuindo, assim, para um melhor funcionamento do trato digestivo (HA e ZEMEL, 2003). Os benefícios da ingestão de GOS são o aumento da população de bifidobactérias no cólon e, por efeito antagônico, a supressão da atividade de bactérias putrefativas, reduzindo a formação de metabólitos tóxicos e a produção de ácidos graxos de cadeia curta (SANTOS *et al.*, 2009; GAMBELLI, 2017).

A remoção da lactose dos derivados lácteos (leite, soro de leite) tem sido extensamente estudada devido aos problemas nutricionais (intolerância à lactose) e aos interesses tecnológicos (solubilidade, poder adoçante e funcionalidade) envolvidos no desenvolvimento de produtos baseados na indústria de laticínios.

2.4 Hidrólise da Lactose

A lactose é um dissacarídeo que, ao sofrer hidrólise, forma como produtos, glicose e galactose. Os dois monossacarídeos são unidos por uma ligação entre o carbono-1 da galactose e o carbono-4 da glicose como mostrado na Figura 2.3 (ZADOW, 1984).

Em princípio, a reação de hidrólise da lactose forma uma mistura isomolecular de glicose e galactose. Na prática, dependendo das condições, a mistura isomolecular não é alcançada, pois a galactose pode polimerizar ou se unir à lactose para formar oligossacarídeos (RODRIGUES JUNIOR *et al.*, 2016). As estruturas da lactose, galactose e glicose estão representadas na Figura 2.4.

Dependendo do nível da hidrólise, o leite com lactose pré-digerida terá um gosto ligeiramente mais doce. Isto é causado pelo poder adoçante mais elevado da glicose mais galactose em comparação com a lactose (OBÓN *et al.*, 2000).

O xarope produzido pela hidrólise da lactose pode ser utilizado como fonte de açúcar e, em alguns casos proteínas, em produtos de panificação, produtos de confeitaria, sorvetes, sobremesas, sucos de frutas, bebidas energéticas para atletas ou base para a produção de álcool (RODRIGUES JUNIOR *et al.*, 2016).

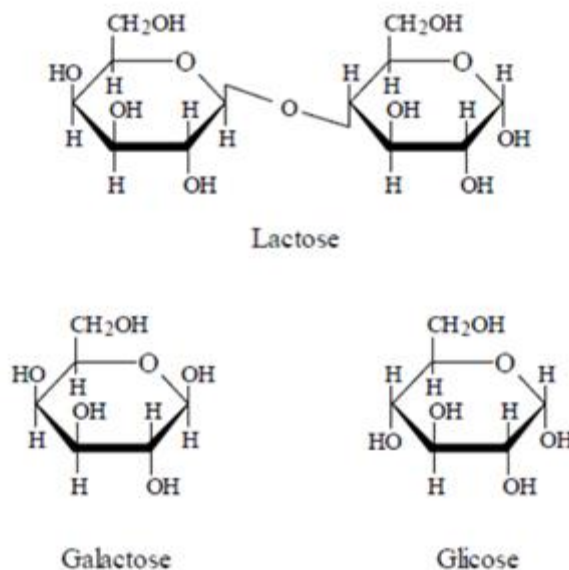


Figura 2.4 - Estruturas da lactose, galactose e glicose.

Fonte: Adaptado de Zadow (1984)

De acordo com Jurado *et al.*, (2002), as vantagens de se produzir um derivado lácteo com reduzido teor de lactose são:

- a) Obtenção de produtos aptos ao consumo para grupos populacionais intolerantes à lactose;
- b) Formação de substâncias que favorecem o crescimento da microflora intestinal, desejáveis à saúde humana, precisamente os galacto-oligossacarídeos (GOS);
- c) Obtenção de melhores características tecnológicas em derivados lácteos, tais como melhor solubilidade e redução de riscos de cristalização em sorvetes, doce de leite e leite condensado;
- d) Obtenção de melhores características sensoriais em derivados lácteos, tal como incremento no poder adoçante, implicando menor adição de sacarose e, conseqüentemente, na redução no conteúdo calórico;
- e) Obtenção de melhores características reológicas, como a melhor textura e a maior cremosidade, em especial na redução do ponto de congelamento de sorvetes;
- f) Formação de monossacarídeos que auxiliam no metabolismo do fermento em produtos fermentados, como iogurtes e bebidas lácteas;
- g) Redução da probabilidade de ocorrência da reação de Maillard.

Existem dois métodos principais para a hidrólise da lactose, o método ácido e o método enzimático (Figura 2.5):

- a) Método ácido: a reação é muito rápida, depende do uso de altas temperaturas, que podem variar de 90 °C a 150 °C e da adição de ácidos fortes em altas

concentrações (como sulfúrico e clorídrico), levando o pH da solução para valores tão baixos quanto 1,5. Tem aplicação restrita na indústria alimentícia, pois acarreta alterações no sabor e na cor dos alimentos, além de causar desnaturação das proteínas do leite (OZBEK *et al.*, 2006);

- b) Método enzimático: pode ser aplicado no leite ou no soro sem um tratamento prévio. A hidrólise é catalisada pela β -galactosidase e se processa em condições amenas de pH e temperatura (30 °C a 40 °C), o que reduz não só a possibilidade de alteração dos compostos sensíveis ao calor, mas também as necessidades energéticas de corrosão do meio sobre equipamentos e a formação de subprodutos indesejáveis. Os produtos obtidos por este processo preservam as suas propriedades, aumentando seu poder adoçante relativo (BAILEY e OLLIS, 1986; LADERO *et al.*, 2000; RODRIGUES JUNIOR *et al.*, 2016).

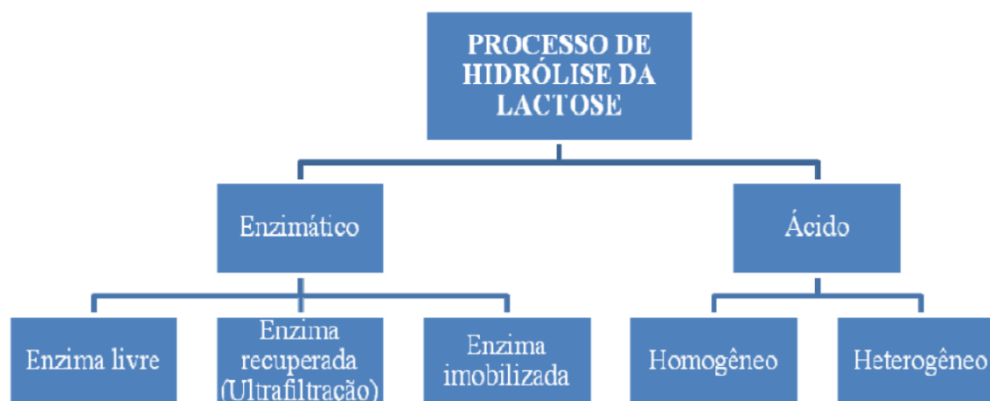


Figura 2.5 - Processos de hidrólise da lactose.

Fonte: Adaptado de HOBMAN, 1984.

A hidrólise enzimática é um dos métodos mais interessantes para a redução do teor de lactose no leite e seus derivados. Este processo é conhecido e utilizado em escala industrial. Numerosos trabalhos sobre hidrólise de lactose têm sido apresentados na literatura, por exemplo:

Haider e Husain (2009) compararam a hidrólise da lactose de leite/soro utilizando β -galactosidase encapsulada em alginato de cálcio em reator batelada e reator leito fixo. Neste trabalho, 86 e 77 % da lactose presente no soro e no leite, respectivamente, foram hidrolisadas em processo batelada após três horas de reação.

Elnashar e Yassin (2009) imobilizaram covalentemente a β -galactosidase em polímeros termicamente estáveis e obtiveram 70 % de conversão após sete horas de operação.

Guidini *et al.*, (2011) estudaram a cinética da hidrólise da lactose por β -galactosidase imobilizada em resina de troca iônica Duolite A 568. O modelo cinético que melhor se ajustou aos resultados experimentais foi o modelo de Michaelis-Menten, com inibição competitiva pela galactose.

Ansari e Husain (2012) estudaram a hidrólise de lactose do leite/soro em processos contínuo e batelada utilizando β -galactosidase imobilizada em A-Celite 545. A hidrólise da lactose em reator contínuo utilizando β -galactosidase reticulada foi de 92 e 81 % nas vazões de 20 e 30 mL h⁻¹ após um mês de operação, respectivamente.

Os processos de quebra da lactose de maior interesse industrial são a hidrólise do soro de leite e do leite integral. Nos processos encontrados na literatura observou-se que não ocorre recuperação da lactase, o que torna os produtos sem lactose mais caros para o consumidor devido ao custo elevado da enzima. Para fins de comparação, a lactase para uso industrial possui custo médio de R\$ 160,00 / m³ de leite (RICANATA, 2019).

A seguir, na Figura 2.6, são ilustrados os processos de fabricação desses produtos

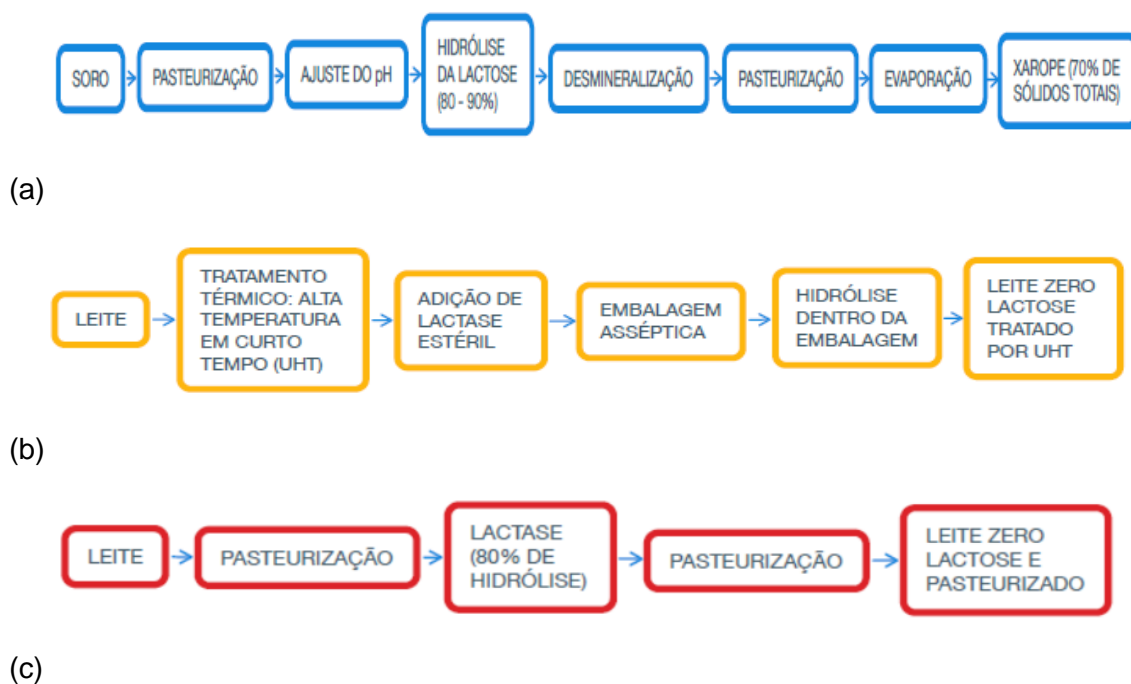


Figura 2.6 – Fluxograma do processo de fabricação do sem lactose leite: (a) hidrólise química (ácido), (b) enzimático (método 1), (c) enzimático (método 2).

Fonte: Adaptada de Schmidell *et al.*, (2001),

2.5 Enzimas

Em todas as células vivas ocorrem ininterruptamente reações que, devido à sua grande complexidade, deveriam ser muito lentas nas temperaturas em que se processam

– ao redor de 37 °C. No entanto, estas reações são muito rápidas, o que leva à conclusão de que existem, nas células vivas, substâncias catalisadoras que diferem dos catalisadores inorgânicos pelo fato de serem substâncias muito mais complexas, produzidas pelo organismo vivo. Elas são denominadas enzimas e podem ser definidas de um modo geral como substâncias orgânicas, formadas no interior das células vivas, mas capazes de agir também fora das células. São fatores importantes na tecnologia de alimentos pelo papel que desempenham no seu processamento e deterioração (BOBBIO e BOBBIO, 1992). São catalisadores biológicos, consistindo de proteínas, as quais participam de muitas reações químicas que ocorrem no dia-a-dia. Ao contrário dos catalisadores químicos ordinários, as enzimas possuem a habilidade de catalisar uma reação sob condições brandas em soluções aquosas neutras, sob temperaturas e pressões normais, e com alto grau de especificidade (LEHNINGER *et al.*, 2014). Como qualquer outro catalisador, uma enzima leva à reação catalisada a sua posição de equilíbrio mais rapidamente do que ocorreria sem catalisador, acelerando uma reação termodinamicamente possível, sem alterar a energia livre de Gibbs (ΔG) nem a constante de equilíbrio (K_{eq}).

As enzimas são proteínas altamente especializadas, atuando como catalisadores de sistemas biológicos muito potentes e eficazes, elas vêm se tornando uma poderosa ferramenta catalítica em uma vasta variedade de processos químicos (BOBBIO e BOBBIO, 1992). A principal característica de uma enzima é sua elevada especificidade, fato este relacionado à sua complexa formação tridimensional. Devido a isto, sua estrutura favorece processos envolvendo oxidações, condensações, hidroxilações ou hidrólises muito específicas (LEHNINGER *et al.*, 2014). Cada enzima tem um sítio catalítico ou sítio de ligação, na qual uma parte ou toda molécula do reagente pode se ligar. Quando o substrato se fixa ao sítio catalítico, forma-se uma combinação temporária chamada de complexo enzima-substrato. Quando o substrato se liga à enzima, ele fica exposto ao sítio ativo da mesma, onde os grupos funcionais das cadeias laterais dos aminoácidos da enzima agem sobre a molécula do substrato, enfraquecendo as ligações e, assim, favorecendo a ruptura e formação de novas ligações, transformando-se em produto (BAILEY e OLLIS, 1986). A reação é catalisada pelo “ataque” destas cadeias laterais da enzima numa ligação da molécula de substrato.

Com o rápido crescimento de produtos industrializados e o desenvolvimento tecnológico, novas prioridades estão sendo estabelecidas para promover o aumento na qualidade e no tempo de conservação dos alimentos. Nos últimos anos, o uso comercial de enzimas tem expandido, de um papel significativo, para um importante aspecto do processamento de alimentos. Neste contexto, a Indústria Alimentícia passou a introduzir novas técnicas em sua linha de fabricação, utilizando a catálise biológica, envolvendo

enzimas e outros compostos do ponto de vista comercial, tais como antioxidantes, aromatizantes e adoçantes (REED e NAGODAWITHANA, 1993; MARIOTTI *et al.*, 2008).

A adição de enzimas aos produtos, principalmente na indústria de alimentos e de rações contribui para a modificação de matérias-primas ou obtenção de produtos específicos, destacando-se os usos em panificação, na modificação de materiais amiláceos, na fabricação de sucos de frutas, na modificação de proteínas e na fabricação de bebidas alcoólicas e de laticínios (MARIOTTI *et al.*, 2008).

A enzima β -galactosidase é amplamente indústria de alimentos, tanto no processamento de leite como de seus derivados lácteos. O tratamento da lactose presente no leite, seus derivados e no soro, pela ação da β -galactosidase, é hoje motivo de estudo para muitos pesquisadores. Esse tratamento torna o leite adequado para a alimentação de indivíduos intolerantes à lactose. Além disso, as β -galactosidases são, também, galacto-transferases, enriquecendo os produtos lácteos com galacto-oligossacarídeos, constituindo, assim, importantes pesquisas na última década (JURADO *et al.*, 2002, MARIOTTI *et al.*, 2008).

2.6 Enzima β -galactosidase

A enzima β -galactosidase (E.C. 3.2.1.23), também conhecida como β -galactosidase, é uma hidrolase produzida por uma grande variedade de seres vivos. Enzimas de fontes distintas possuem características físicas e químicas diferentes quanto às condições de hidrólise da lactose. Esta enzima hidrolisa a ligação β (1-4) da molécula da lactose, dando origem aos seus monômeros, glicose e galactose, de grande interesse para a indústria de laticínios (SABIQ *et al.*, 2017; ÁLVAREZ-CAO *et al.*, 2019).

Esta enzima pode ser encontrada na natureza em frutos (amêndoas, pêssego, damasco, maçã), em órgãos de animais (intestino, cérebro, testículos, placenta) e, também, são produzidas por grande quantidade de micro-organismos, como bactérias, fungos filamentosos e leveduras, sendo estes dois últimos as principais fontes para aplicações comerciais (SANTIAGO *et al.*, 2004). A Tabela 2.3 descreve algumas características de algumas dessas enzimas.

A legislação brasileira, por meio da Resolução RDC nº 205/2006, que a enzima β -galactosidase, utilizada na indústria de alimentos, deve ser de origem microbiana, proveniente dos seguintes microrganismos: *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Candida pseudotropicalis*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces fragilis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Saccharomyces sp.* (BRASIL, 2006). Tais espécies são classificadas como *Generally Recognized As Safe* (GRAS) pela *Food and Drug Administration* (FDA), sendo esse um importante critério para aplicações alimentícias.

Tabela 2.3 - Características da enzima β -galactosidase de fungos, bactérias e leveduras

Origem	pH _{ótimo}	T _{ótima}	K _m (mM) Lactose	M, kDa	Ativador	Inibidor
Fungos:						
<i>Aspergillus niger</i>	3,5	58	85	124	-	-
<i>Aspergillus oryzae</i>	5,0	55	50	90	-	-
Levedura:						
<i>Kluyveromyces lactis</i>	6,5	37	35	118	K ⁺ , Mg ²⁺	Ca ²⁺ , Na ²⁺ Zn, Cu
<i>Kluyveromyces fragilis</i>	6,6	30	0,23-0,99 (oNPG)	200	-	SDS
<i>Sterigmatomyces elviae</i> CBS8119	6,0	60	-	-	Fe ²⁺ Zn ²⁺ Cu ²⁺	-
Bactéria:						
<i>Escheria choli</i>	7,2	40	2	540	Na ⁺ , K ⁺	-
<i>Bacillus subtilis</i>	6,5	50	700	-	-	-
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	6,2	55	2	220	Mg ²⁺	-
<i>Lactobacilus thermophilus</i>	6,2	55	6	540	-	-
<i>Lactobacilus reuteri</i> L103	8,0	45	13	35	Na ⁺ , K ⁺ , Mn ²⁺	Fe ²⁺ , Ca ²⁺ , Cu ²⁺ , Zn ²⁺
<i>Lactobacilus reuteri</i> L461	6,5	50	31	72	Na ⁺ , K ⁺ , Mn ²⁺	Fe ²⁺ , Ca ²⁺ , Cu ²⁺ , Zn ²⁺
<i>Bullera singulans</i> KCTC 7534	5	50	580	53	-	Ag ³⁺ , SDS
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	7,0	70	2,9	362	-	Fe ²⁺ , Zn ²⁺ , Cu ²⁺ , Pb ²⁺ , Sn ²⁺
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	4,8	45	800	362	EDTA	Zn ²⁺ , Mn ²⁺ , Co ²⁺ , Ca ²⁺ , Sn ²⁺
<i>Bifidobacterium infantis</i>	5,0	60	2,96	470	Na ⁺ , K ⁺	Cr ³⁺ , EDTA, Ureia, Galactose, PCMB
<i>Bacillus circulans</i>	6,0	65	41,7	67	-	-
<i>Bacillus coagulans</i>	6,5	55	50	430	EDTA	Fe ³⁺ , Cu ²⁺ , Zn ²⁺ , Galactose

kDa= kiloDalton (valores para a subunidade); oNPG= o-nitrofenil; SDS= dodecil sulfato de sódio; EDTA= etileno diamina tetra acético; PCMB= p-cloro-mercúrio-benzoato.

Fonte: Adaptado de Otieno (2010).

Os micro-organismos mais utilizados para a produção desta enzima são *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces fragilis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Aspergillus niger* e *Aspergillus oryzae* (ANDRADE e MARTINS, 2002). Como visto na Tabela 2.3, as propriedades das β -galactosidases dependem da sua fonte. Aquela extraída de *Escherichia coli* possui a maior massa molar (520.000 a 850.000 g mol⁻¹), enquanto aquelas de menor massa molar são extraídas de *Kluyveromyces fragilis* (201.000 g mol⁻¹) e *A. oryzae* (90.000 g mol⁻¹) (GEKAS e LOPEZ-LEIVA, 1985). Mozaffar *et al.*, (1984) determinaram que quanto menor a massa molecular da β -galactosidase, maior a formação de oligossacarídeos.

Enzimas de leveduras do gênero *Kluyveromyces* são ativas a pH neutro e, portanto, empregadas na hidrólise do leite e soro de leite. A estrutura das enzimas de *Kluyveromyces lactis* apresenta-se como um tetrâmero formado pela associação de dois dímeros idênticos, sendo que cada monômero consiste de 1024 resíduos de aminoácidos, com massa molecular de 119 kDa. O tetrâmero é composto por quatro subunidades idênticas A, B, C e D (Figura 2.7). Os monômeros A-C e B-D formam dois dímeros idênticos. A montagem destes dímeros ocorre essencialmente pela interação entre os monômeros A e B, embora haja também alguns contatos entre os monômeros A e D, e os monômeros B e C, que ajudam a estabilizar o tetrâmero. A maioria dos contatos nas interfaces são interações não polares (~ 75 % para a superfície 1 e ~ 65 % para as superfícies 2 e 3) (PEREIRA-RODRIGUES *et al.*, 2012).

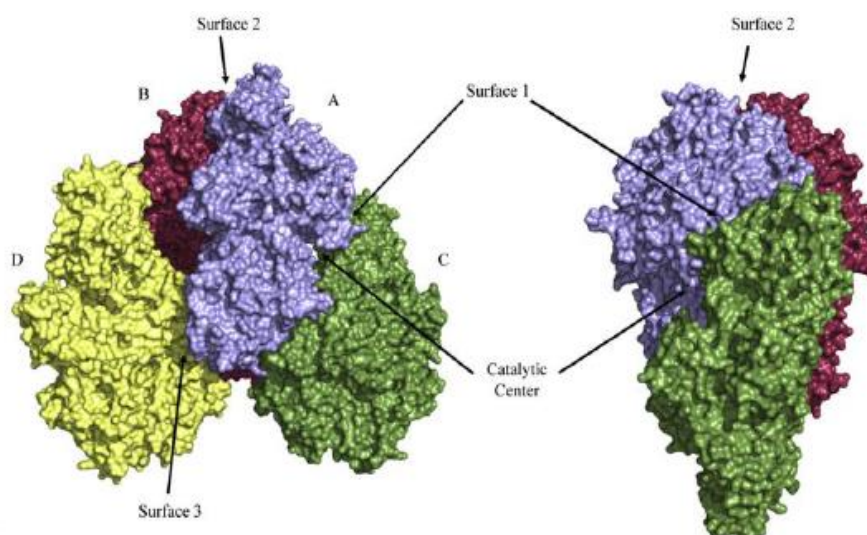


Figura 2.7 - Representação da superfície do tetrâmero da enzima β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis*. Cadeia A é representada em azul, B em verde, C em vermelho e D em amarelo. As três interfaces diferentes entre os monômeros são nomeadas como Superfície 1 (A-C), Superfície 2 (A-B) e Superfície 3 (A-D).

Fonte: Adaptado de Pereira-Rodrigues *et al.*, (2012)

A temperatura ótima de *Kluyveromyces lactis* está entre 35 – 40 °C (CAVILLE e COMBES, 1995). Galactose e glicose são inibidores competitivos e não-competitivos, respectivamente, sendo a inibição por glicose ($K_i = 794$ nM) muito menor que a inibição por galactose ($K_i = 42$ nM). Sua atividade enzimática é inibida por zinco e cobre, sendo que os íons Mg^+ e K^+ são importantes para a estabilidade da enzima e o íon Mg^{+2} tem efeito estimulatório sobre sua atividade (CAVILLE e COMBES, 1995; PEREIRA-RODRIGUES *et al.*, 2012). No sítio ativo desta enzima, os grupos envolvidos na catálise enzimática são dois resíduos de ácido glutâmico (Glu482 e Glu551), localizados no centro de cada monômero (PEREIRA-RODRIGUES *et al.*, 2012). É ainda caracterizada por possuir alta atividade hidrolítica (GEKAS e LOPES-LEIVA, 1985), porém apresenta algumas desvantagens no que diz respeito à sua atividade de transgalactosilação e estabilidade térmica para a produção de galacto-oligossacarídeos (PARK e OH, 2010).

Industrialmente, a enzima β -galactosidase tem grande importância tanto por sua utilização no rompimento das ligações glicosídicas da lactose, formando uma solução de glicose e galactose, com leve aumento do sabor doce, como por sua função de catalisador na síntese de oligossacarídeos. Além disso, sua importância reside também na redução de problemas como eliminação do soro, cristalização da lactose em alimentos congelados e o consumo de leite e derivados por pessoas intolerantes à lactose (ALMEIDA *et al.*, 2004; SANTOS *et al.*, 2009).

A enzima β -galactosidase é usada tanto para catalisar as reações de hidrólise como as de transgalactosilação, ou seja, a enzima transfere a unidade de galactose para um acceptor que contenha um grupo hidroxila. Na hidrólise, com a água atuando como acceptor, são formadas glicose e galactose. Contudo, a lactose presente na solução pode também servir como acceptor e, assim, são formados os galacto-oligossacarídeos por meio da reação de transgalactosilação (LISBOA *et al.*, 2012).

A Figura 2.8 mostra o esquema das duas rotas de conversão da lactose por meio da enzima β -galactosidase.

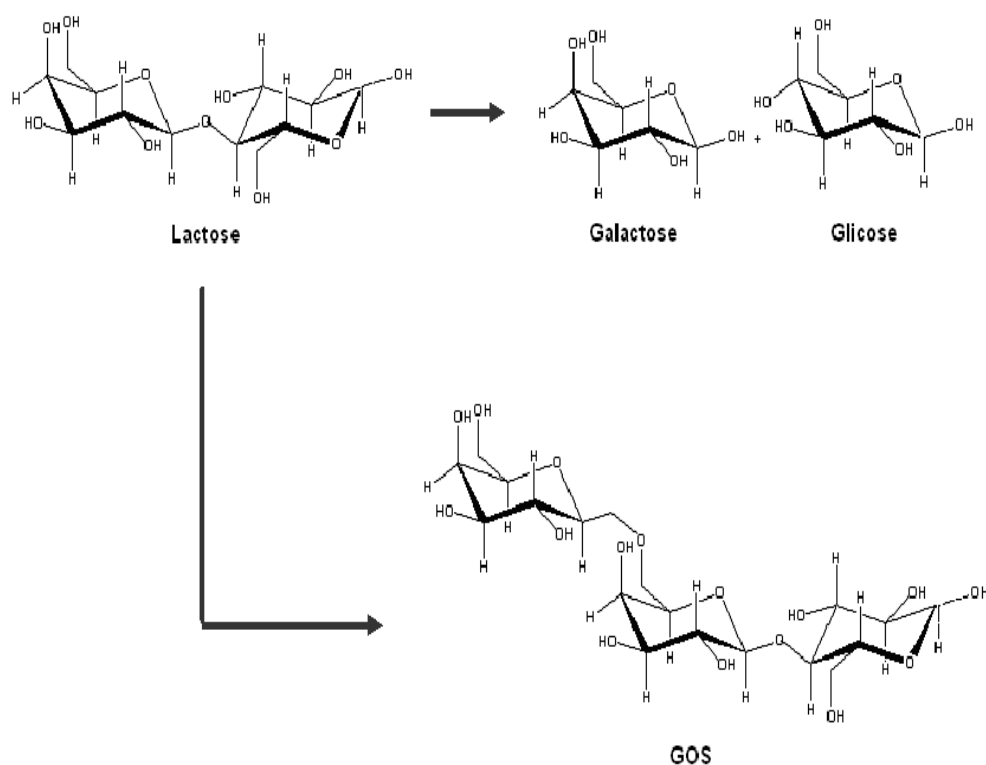
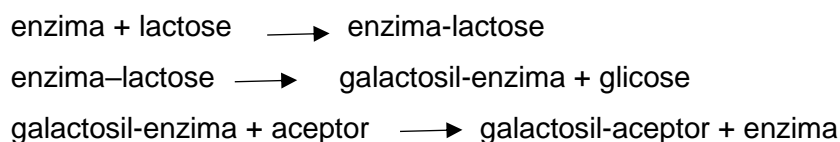


Figura 2.8 - Rotas enzimáticas da conversão da β -galactosidase

Fonte: Adaptado de Martins e Burket (2009).

2.6.1 Mecanismo de ação da enzima β -galactosidase

Embora estejam disponíveis na literatura vários trabalhos sobre a cinética de várias fontes de β -galactosidase, sobre o seu mecanismo de ação pouco se sabe. A ação da β -galactosidase pode ser descrita por um mecanismo geral, envolvendo um mínimo de três etapas, as quais envolvem tanto as reações de hidrólise como as reações do grupo galactosil, esquematizados da seguinte maneira (MAHONEY, 1998):



A Figura 2.9 apresenta um esquema do mecanismo de ação da β -galactosidase de natureza transgalactosídica.

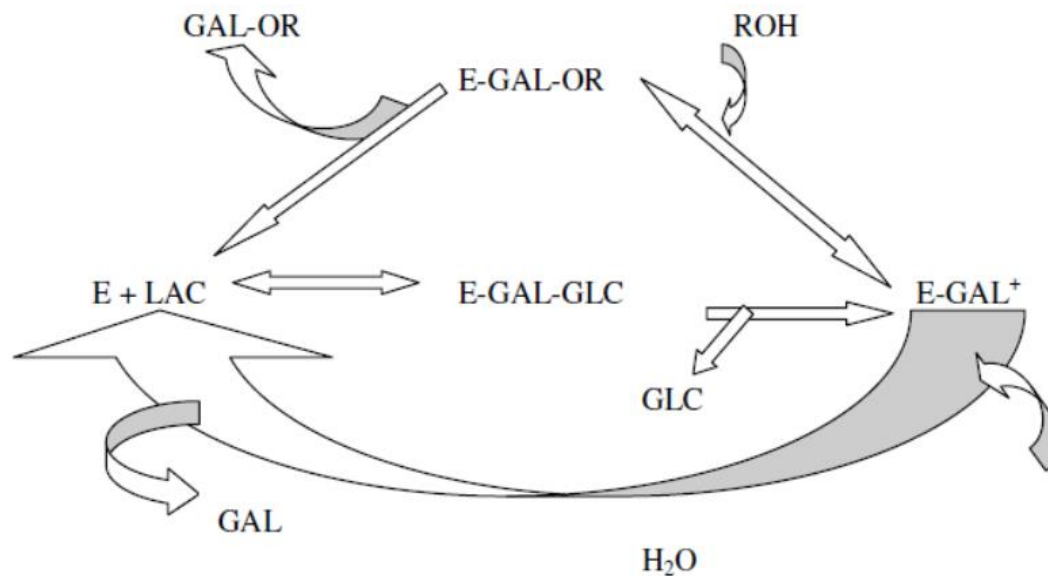


Figura 2.9 - Mecanismo de reação proposto para ação da enzima β-galactosidase sobre a lactose. LAC, lactose; GAL, galactose; GAL+, estado de transição da galactose; GLC, glicose; ROH, açúcar receptor e GAL-OR, açúcar galactosil (oligossacarídeos)

Fonte: Adaptado de Mahoney (1998).

O mecanismo da ação da enzima β-galactosidase descrito na Figura 2.9 indica que a mesma pode transferir galactose aos receptores nucleofílicos contendo um grupo hidroxila. Quando o receptor é água, o resultado é galactose; quando o receptor é um outro açúcar, o resultado é di-, tri- e sacarídeos maiores, chamados de forma coletiva de oligossacarídeos. Uma vez que todos os açúcares presentes podem atuar como receptores, o resultado é uma mistura complexa (MAHONEY, 1998).

Trabalhos indicam que β-galactosidases de diferentes fontes resultam em diferentes quantidades e natureza dos oligossacarídeos. Outros parâmetros principais que influenciam na formação de oligossacarídeos são o tempo de reação, a concentração e a natureza do substrato. No caso da enzima de *Escherichia coli*, ela também é afetada pelo pH, concentração de Mg²⁺ e configuração anomérica de lactose (HUBER *et al.*, 1976).

A conversão da lactose em GOS por ação da enzima β-galactosidase é uma reação cineticamente controlada e responde a um modelo de competição Figura 2.9 entre a reação de transgalactosilação e hidrólise. O mecanismo bioquímico de síntese de GOS é complexo e pode ser resumido da seguinte forma: o primeiro passo é a formação de um complexo enzima-galactosil e a simultânea liberação da glicose. Em uma segunda etapa, o complexo enzimagalactosil é transferido para um aceptor que contenha um grupo hidroxil. Em uma solução com baixa concentração de lactose, água, em vez de outros açúcares é

mais competitiva para ser o acceptor deste complexo, sendo liberada, neste caso, a galactose (MAHONEY, 1998; GOSLIN *et al.*, 2010; TORRES *et al.*, 2010).

Por outro lado, se a concentração de lactose no sistema for alta, as moléculas de lactose e demais mono, di e oligossacarídeos, têm mais chances de atuarem como aceptores do complexo enzima-galactosil, formando, assim, os GOS (TORRES *et al.*, 2010; MICHELON *et al.*, 2014). Enzimas β -galactosidases oriundas de fontes distintas diferem quanto à seletividade à água e às moléculas de açúcar, e que mesmo em concentrações iguais de lactose inicial, resultam em rendimentos de GOS, estruturas e tipos de ligações glicosídicas diferentes (GOSLIN *et al.*, 2010; OTIENO *et al.*, 2010).

Em geral, a quantidade total de oligossacarídeos formados varia de 1 a 45 % dos açúcares totais presentes (PRENOSIL *et al.*, 1987). Entre as enzimas de interesse comercial, a β -galactosidase de *Aspergillus niger* produz menos oligossacarídeos que a de *Aspergillus oryzae* e a de *Kluyveromyces lactis* produz menos do que a de *Kluyveromyces fragilis* (OTIENO *et al.*, 2010).

A concentração de oligossacarídeos depende da sua velocidade relativa de formação e decomposição por hidrólise. Conseqüentemente, os níveis variam com as mudanças do grau de hidrólise da lactose que ocorrem durante a reação, em consequência dos diferentes níveis de receptores.

2.6.2 Aplicações da β -galactosidase

Os benefícios nutricionais e tecnológicos do uso da enzima β -galactosidase vem sendo estudados. Alguns estudos (LI *et al.*, 2012; JIMENEZ *et al.*, 2014; DE VRESE *et al.*, 2015; ROSKAR *et al.*, 2017) foram realizados com uso de administração oral da enzima microbiana em indivíduos com intolerância à lactose, e os efeitos da intolerância foram minimizados.

Algumas preparações comerciais disponíveis contendo a enzima β -galactosidase estão apresentadas na Tabela 2.4. Com base nela, pode-se constatar que a maioria das β -galactosidases comerciais destinadas a aplicação industrial são provenientes da levedura *Kluyveromyces lactis*, apresentando atividade enzimática variável com valores entre 2000 e 6500 U mL⁻¹ (1 unidade de atividade da β -galactosidase -1 U – é definida como a quantidade de enzima capaz de hidrolisar 1 μ mol de substrato por minuto).

As preparações enzimáticas para administração oral são exclusivamente originárias de *Aspergillus oryzae*, com atividade variando entre 1000 e 10000 U mL⁻¹. Há, ainda, os padrões analíticos de β -galactosidase (SIGMA ALDRICH, 2018 a, b e c), provenientes de diferentes fontes microbianas, como *Escherichia coli*, *Kluyveromyces lactis* e *Aspergillus oryzae*, com atividade variável conforme a fonte microbiana (entre 8 e 15 000 U mL⁻¹).

Com relação ao seu uso em alimentos, a β -galactosidase é utilizada na fabricação de vários produtos, dentre eles: leite com teor reduzido ou zero lactose, produtos lácteos livres de lactose, como: iogurte; sorvetes; leite condensado; creme de leite; doce de leite e queijos; incorporação em medicamentos para indivíduos com intolerância à lactose; produção de xaropes alimentícios; tratamento da lactose contida no soro e permeado do soro e produção de galacto-oligossacarídeos (SABIQ *et al.*, 2017).

Tabela 2.4 - Preparações enzimáticas comerciais contendo β -galactosidases.

	Produto	Empresa	Micro-Organismo originário	Atividade (U mL ⁻¹)	Referência
Aplicação Industrial	Lactozym®Pure	Novozymes	<i>Kluyveromyces lactis</i>	6500	Novozymes (2018)
	Maxilact®	Danisco	<i>Kluyveromyces lactis</i>	2500 - 3500	Dsm (2018)
	Granolact® 6500L	Granolab	<i>Kluyveromyces lactis</i>	6500	Granotec (2018)
	Biolacta® N5	Daiwa Kasei	<i>Bacillus circulans</i>	2000	Warerdam <i>et al.</i> , (2013)
Administração Oral	Dairy Digestive Supplement - Lactase®	Equate	<i>Aspergillus oryzae</i>	9000	Equate (2013)
	Deslac®	Maxinutri	<i>Aspergillus oryzae</i>	2500 - 10000	Maxinutri (2019)
	Enzima Lactase®	Muwiz	<i>Aspergillus oryzae</i>	4500	Muwiz (2018)
	Kal Lactase®	Kal	<i>Aspergillus oryzae</i>	1000	Swanson (2019)
	Lacdose®	Lacdose	<i>Aspergillus oryzae</i>	1875	Webmd (2018)
	Lactaid®	Lactaid	<i>Aspergillus oryzae</i>	9000	Lactaid (2018)
	Perlatte®	Eurofarma	<i>Aspergillus oryzae</i>	9000	Eurofarma (2018)
Padrão Analítico	G5635 SIGMA®	Sigma Adrich	<i>Escherichia coli</i>	1000; 3000; 5000 e 15000	Sigma Adrich (2018 b)
	G3665 SIGMA®	Sigma Adrich	<i>Kluyveromyces lactis</i>	≥2600	Sigma Adrich (2018 c)
	G5160 SIGMA®	Sigma Adrich	<i>Aspergillus oryzae</i>	8; 25; 125 e 500	Sigma Adrich (2018 a)

Fonte: A autora.

2.7 Probióticos, Prebióticos e Simbióticos

Probióticos são definidos como microrganismos vivos os quais quando administrados em quantidades adequadas conferem benefícios à saúde do hospedeiro (OLIVEIRA *et al.*, 2017). Contudo, para conferir benefícios à saúde, as bactérias probióticas devem chegar ao intestino vivas e em quantidades suficientes, em torno de 6 a 7 log UFC / g (KUMAR e KUMAR, 2016). O emprego de bactérias probióticas em produtos lácteos fermentados tem sido amplamente estudado devido às dificuldades de manutenção da viabilidade destes microrganismos ao longo da estocagem refrigerada. Alimentos probióticos devem conter linhagens específicas de microrganismos probióticos e manter um nível apropriado de células viáveis durante o armazenamento do produto, sem interferir no sabor e textura (GALLINA *et al.*, 2012).

Os prebióticos são moléculas que fornecem nutrientes para as bactérias benéficas do cólon, que não são absorvidos nem hidrolisados pelas enzimas digestivas na parte superior do trato gastrointestinal. Desta forma, prebióticos são ingredientes alimentícios não digeríveis, que estimulam seletivamente o crescimento e/ou atividade de bactérias benéficas no cólon, como as bifidobactérias e os lactobacilos, em detrimento da diminuição de bactérias patogênicas como *Clostridium difficile*, conferindo benefícios à saúde do hospedeiro (WANG e GIBSON, 1993; GIBSON e ROBERFROID, 1995; SAAD, 2006). Além do efeito desejável do aumento de bifidobactérias e lactobacilos, ácidos graxos de cadeia curta são produzidos como produtos finais da fermentação com oligossacarídeos, com implicações positivas na prevenção do câncer de cólon (CUMMINGS, 1981, SLAVIN, 2013).

Simbióticos são produtos que contém uma combinação de probióticos e prebióticos (CRITTENDEN *et al.*, 2001). Esta associação beneficia o hospedeiro, pois há introdução direta de bactérias viáveis no organismo pela ingestão das culturas probióticas, e promoção do crescimento de bactérias benéficas já existentes no cólon por meio da fermentação seletiva do prebiótico (MATILLA-SANDHOLM *et al.*, 2002). No entanto, tais produtos só são viáveis quando a composição de cada agente isolado é adequada, ou seja, são necessárias culturas probióticas em contagens superiores a 10^6 UFC g⁻¹ e prebióticos, como a inulina, em teores mínimos de 1,5 g na porção diária, para alimentos líquidos (GRANATO *et al.*, 2010).

Segundo Delzenne e Roberfroid (1994), carboidratos não digeríveis incluem diversos compostos como amido resistente, polissacarídeos de parede celular, pectinas, gomas, hemicelulases e oligossacarídeos. No entanto, nem todos são classificados como prebióticos, pois o processo de fermentação no cólon não é específico, uma vez que diferentes espécies de bactérias, incluindo as potencialmente prejudiciais, têm o

crescimento e/ou atividade metabólica estimulada (DRASAR *et al.*, 1976; MACZULAK *et al.*, 1993; WANG e GIBSON, 1993).

Os carboidratos não digeríveis que satisfazem os critérios para serem considerados prebióticos são a lactulose e os galacto-oligossacarídeos (GOS), obtidos a partir da lactose, e os fruto-oligossacarídeos (FOS), obtidos a partir da sacarose, sendo os dois últimos os ingredientes alimentícios funcionais mais utilizados (GIBSON *et al.*, 2004; MANUCCI, 2009), contudo, existem pesquisas sendo feitas para avaliar o potencial prebiótico de novos oligossacarídeos como lactosacarose, sintetizada a partir de sacarose e lactose, por levansacarases, β -galactosidases e β -frutosidases; xilo-oligossacarídeos, obtidos por hidrólise enzimática usando β -xilanase; glico-oligossacarídeos, sintetizados empregando sacarose mediante glicosiltransferase como altenansacarases ou dextransacarases, entre outros (MANUCCI, 2009; KLEIN *et al.*, 2012), como mostra a Figura 2.10.

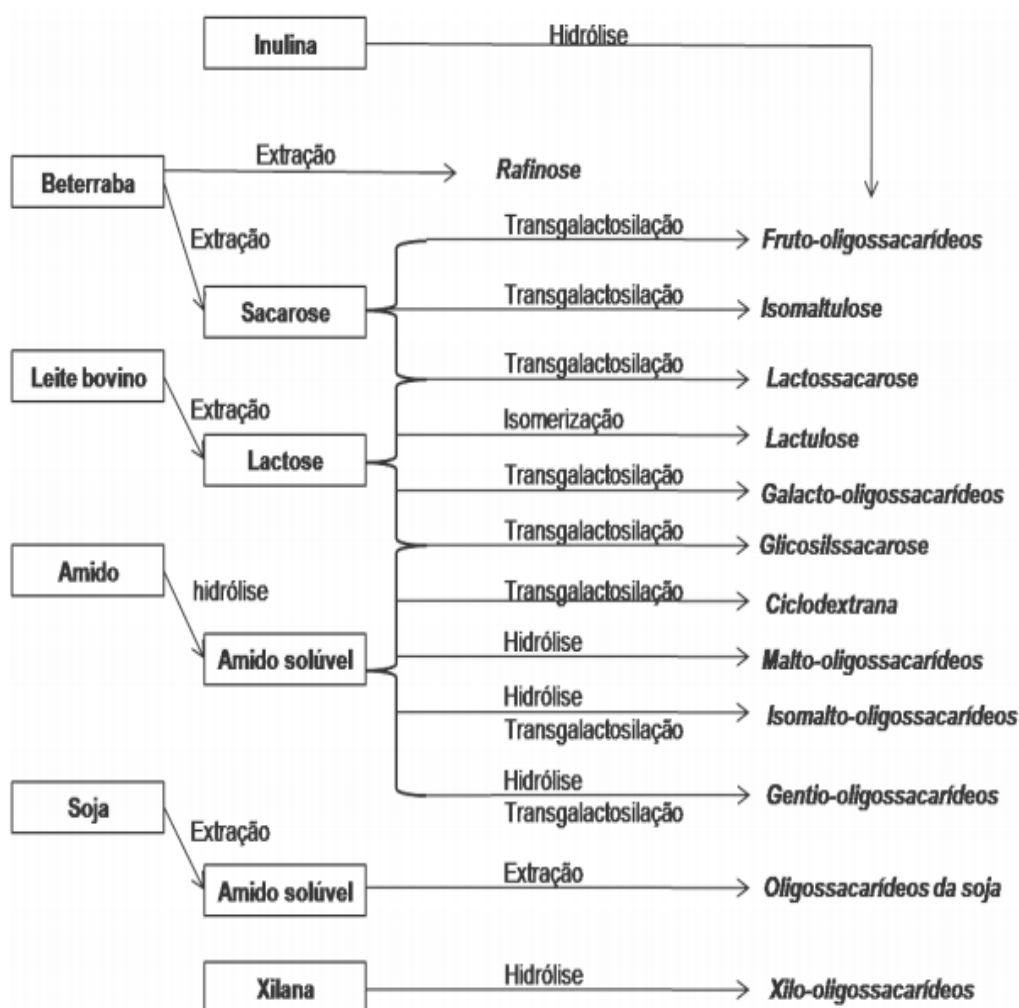


Figura 2.10 - Representação esquemática do processo de produção de oligossacarídeos.

Fonte: Adaptado de Fonseca (2010).

2.8 Oligossacarídeos

Os oligossacarídeos estão incluídos entre os alimentos funcionais por serem considerados prebióticos. Com base nas propriedades fisiológicas, os carboidratos podem ser classificados como digeríveis ou não digeríveis. O conceito de não digestível se origina da observação de que o átomo de carbono anomérico (C1 e C2) das unidades de monossacarídeo, de alguns oligossacarídeos dietéticos, possui uma configuração que impede que sua ligação glicosídica seja quebrada pelas enzimas digestivas do organismo humano (ROBERFROID e SLAVIN, 2000).

Os carboidratos podem ser classificados de acordo com a sua massa molar ou do grau de polimerização (número de unidades de monossacarídeo combinados), em monossacarídeos, oligossacarídeos ou polissacarídeos. De acordo com a nomenclatura da International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC), oligossacarídeos são definidos como sacarídeos contendo entre 3 e 10 moléculas de açúcar. De acordo com Almeida e Pastore (2004), os oligossacarídeos são definidos como carboidratos que contêm entre 2 e 10 monossacarídeos, covalentemente ligados por meio de ligações glicosídicas. Outras autoridades ampliam este limite para 19 moléculas de açúcar. Entretanto, não há uma razão racional fisiológica ou química, para fixação destes limites (VORAGEN, 1998).

Alguns oligossacarídeos são encontrados na forma livre em frutas, vegetais, leite e mel, como os dissacarídeos lactose e sacarose; outros como a maltose e a celobiose são obtidos a partir de hidrólise química ou enzimática do amido e celulose, respectivamente (HIRAYAMA, 2002; ALMEIDA e PASTORE, 2004). Hexassacarídeos, heptassacarídeos e nonassacarídeos também têm sido obtidos por via sintética, a partir de reações de síntese orgânica mediadas por enzimas microbianas como hidrolases e transferases (MONSAN e PAUL, 1995).

Os oligossacarídeos são solúveis em água e possuem um baixo poder adoçante, correspondendo a aproximadamente 0,3 a 0,6 vezes em relação à sacarose. A doçura dos produtos contendo oligossacarídeos está diretamente relacionada com a estrutura química, a massa molecular e níveis de mono e dissacarídeos presentes na mistura. É importante ressaltar que a doçura relativamente baixa dos oligossacarídeos, torna-os bastante desejáveis como ingredientes em produtos onde existe necessidade de acentuar a textura, o sabor e outras propriedades de alimentos com uma doçura reduzida (DAVIES *et al.*, 2001).

Na literatura, um grande número de pesquisas sobre a produção e aplicação de oligossacarídeos e polissacarídeos têm surgido devido às suas propriedades fisiológicas e tecnológicas. Baseando-se em suas propriedades físico-químicas e bioquímicas, os

oligossacarídeos têm encontrado aplicação na indústria de alimentos, em produtos utilizados para a alimentação humana (bebidas, adoçantes, formulação de leite em pó infantil), animal (ração animal com inibidor de salmonela) e aplicação medicinal (cosméticos, produtos farmacêuticos e produtos para diabéticos). Entretanto, o principal interesse na produção de oligossacarídeos não se encontra particularmente no seu uso como adoçante alternativo, mas sim no estímulo da produção de bifidobactérias (DAVIES *et al.*, 2001). Os oligossacarídeos podem ser utilizados em processos biológicos de reconhecimento, como infecções virais e bacterianas, adesão celular, transdução de sinais e comunicações intercelulares (DAVIES *et al.*, 2001, BARRETEAU *et al.*, 2006).

Vários oligossacarídeos não são digeríveis pelo organismo humano, pois não possuem as enzimas necessárias para romper as ligações do tipo β formadas pelas unidades de monossacarídeos. Outros oligossacarídeos são parcialmente hidrolisados no trato gastrointestinal e podem resultar na formação de carboidratos essenciais para a saúde, os quais servem de substratos e reguladores para a maioria das rotas metabólicas (MACFARLANE *et al.*, 2008). Os monossacarídeos resultantes desta hidrólise parcial são transportados pelo sangue até o fígado e, posteriormente, para a circulação sistêmica. Estes carboidratos são essenciais para a saúde, servem como substratos e reguladores das principais vias metabólicas (DELZENNE e ROBERFROIDD, 1994).

Exemplo de oligossacarídeo produzido comercialmente é a inulina, cujo uso em alimentos e os efeitos fisiológicos associados aos seres humanos têm sido estudados nas últimas duas décadas. A inulina é reserva de carboidrato em muitas plantas dicotiledôneas e pode ser extraída de raízes de chicória e de outros vegetais (RUPÉREZ, 1998).

Os fruto-oligossacarídeos podem ser obtidos por meio da hidrólise ácida ou enzimática de polissacarídeos como a inulina e o levana ou pela polimerização da molécula de sacarose, realizada por meio das enzimas β -frutofuranosidase ou frutossiltransferase, presentes em plantas, bactérias, leveduras e fungos filamentosos (SANGEETHA *et al.*, 2005; ARRIZON *et al.*, 2012). A oligofrutose é um fruto-oligossacarídeo importante na indústria de alimentos funcionais, sendo formado por 2 a 4 unidades de frutose ligadas a um resíduo terminal de glicose (PASSOS e PARK, 2003).

Industrialmente, os xilo-oligossacarídeos (XOS) podem ser obtidos a partir de materiais lignocelulósicos ricos em xilana, como resíduos florestais e subprodutos agroindustriais (fontes abundantes de biomassa lignocelulósica). A solubilização e/ou hidrólise da xilana, presente na fração hemicelulósica, em oligômeros de xilose, pode ser realizada por diferentes processos, tais como, auto-hidrólise em água líquida ou explosão a vapor, pré-tratamentos químicos em soluções ácidas diluídas ou oxidativas, extrações alcali diluída ou organossolve e hidrólise enzimática direta da biomassa (QING *et al.*, 2013; VÁZQUEZ *et al.*, 2000). Dentre os diferentes processos de produção de XOS, a via

enzimática, por ação de endoxilanas, é a mais desejável devido à ausência de subprodutos gerados durante a hidrólise e baixa formação de monômeros de açúcares, sem o uso de equipamentos especiais, além de se tratar de um processo limpo que ocorre em condições amenas de pH e temperatura, podendo realizar o reuso das enzimas em alguns casos (imobilizadas).

Os oligossacarídeos não digeríveis mais utilizados como ingredientes em alimentos são os fruto-oligossacarídeos e galacto-oligossacarídeos, que são geralmente produzidos por transglicosilação enzimática (SAKO *et al.*, 1999).

2.9 Galacto-oligossacarídeos (GOS)

Os galacto-oligossacarídeos (GOS) são os oligossacarídeos provenientes da galactose. Estão incluídos entre os oligossacarídeos não digeríveis (NDO, Non Digestible Oligosaccharides) e licenciado como aditivo de alimentos FOSHU (Foods for Specified Health Use) pelo Ministério da Saúde do Japão (SAKO *et al.*, 1999).

Quimicamente, os GOS são formados por moléculas de galactose ligadas à glicose, sendo formados de tri a decassacarídeos com 2 a 9 unidades de galactose, respectivamente (Li *et al.*, 2008). Embora tenha sido relatado que possam ser formados produtos transgalactosilados decassacarídeos, não é usual serem produzidos GOS com cadeias tão extensas (MUSSATTO e MANCILHA, 2007). De acordo com Mahoney (1998), a baixa efetividade da β -galactosidase em produzir GOS de maior massa molecular é explicada pela competitividade da reação de transgalactosilação com a de hidrólise.

Em termos de estrutura química, os GOS podem diferir em relação às seguintes características: composição, regioquímica, ligação glicosídica e grau de polimerização (Figura 2.11). Estas propriedades são dependentes do mecanismo do biocatalisador utilizado e das demais condições reacionais do processo (FRENZEL *et al.*, 2015; GOSLIN *et al.*, 2010).

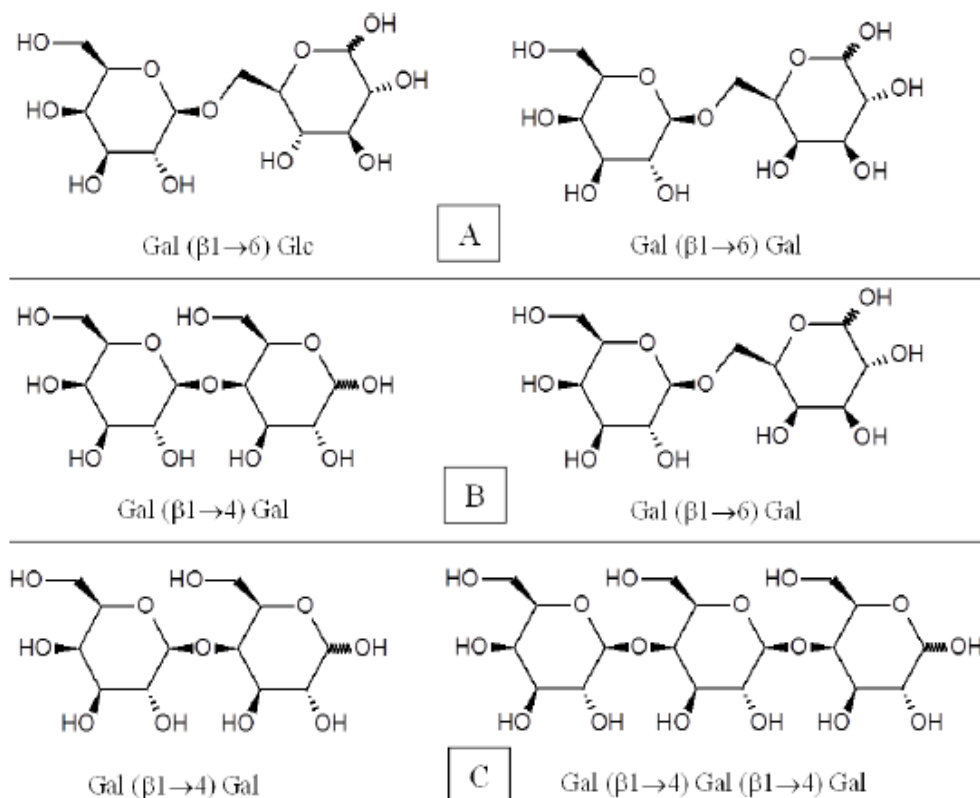


Figura 2.11 - Exemplos de diferentes estruturas de GOS: (A) composição; (B) regioquímica; (C) grau de polimerização.

Fonte: Adaptado de Goslin *et al.*, (2010).

É comum encontrar dissacarídeos transgalactosilados, consistindo em galactose e glicose com ligações β-glicosídicas diferentes da lactose ou com duas unidades de galactose (PARK e OH, 2010; SAKO *et al.*, 1999). É válido ressaltar que todos os tipos de GOS, incluindo os dissacarídeos transgalactosilados, são considerados oligossacarídeos não digeríveis e apresentam propriedades fisiológicas similares, apesar de algumas particularidades e especificidades (CARDELLE-COBAS *et al.*, 2011).

Comercialmente, os GOS são uma mistura de várias espécies moleculares de oligossacarídeos (mais que 55 %), lactose (aproximadamente 20 %), glicose (aproximadamente 20 %) e uma pequena quantidade de galactose, sendo comercializados na forma líquida ou em pó. Os galacto-oligossacarídeos podem ser usados como adoçante, em produtos como: leite fermentado, pães, geleias, bebidas e produtos de confeitaria. O pão é um alimento apropriado para a sua inclusão, pois durante a fermentação com a levedura e o cozimento, os GOS não são degradados e auxiliam no sabor e textura. Leite fermentado com adição de GOS é produzido no Japão e na Europa (CARDELLE-COBAS *et al.*, 2011).

Geralmente, a ocorrência de trissacarídeos é dominante na maioria dos produtos de GOS comerciais. As ligações glicosídicas entre duas unidades de galactose são principalmente ligações β - (1 \rightarrow 4), quando as β -galactosidases derivadas de *Bacillus circulans* e *Cryptococcus laurentii* são utilizadas para a produção de Vivinal GOS pela FrieslandCampina Domo (Holanda) e produtos CUP-oligo pela Nissan. Fabricação co. (Japão), respectivamente (TZORTZIS e VULEVIC, 2009). As enzimas de *B. circulans* também produzem outras ligações glicosídicas em seus produtos GOS como β - (1 \rightarrow 6), β - (1 \rightarrow 3) e β - (1 \rightarrow 2), mas sua quantidade é muito baixa em comparação com produtos ligados a β - (1 \rightarrow 4) (NAKAYAMA e AMACHI, 1999). Os produtos farmacêuticos da Yakult (Japão) usam *Aspergillus oryzae* e *Streptococcus thermophilus* como fonte de β -galactosidase para seus derivados de Oligomatoma 55, que possuem predominantemente ligações β - (1 \rightarrow 6), embora atualmente eles também estejam usando *B. circulans* para produzir produtos ligados a β - (1 \rightarrow 4). A Yakult também está considerando um sistema enzimático duplo, combinando a atividade das β -galactosidases de *A. oryzae* e *B. circulans* para produzir a mistura GOS de ligações β - (1 \rightarrow 4) e β - (1 \rightarrow 6). Outro produto da Yakult, trans-galacto-oligossacarídeos (TOS), tem ligações β - (1 \rightarrow 4), predominantemente. A Tabela 2.5 reúne as características dos principais galacto-oligossacarídeos disponíveis comercialmente.

Os GOS podem ser utilizados como aditivo alimentar em uma ampla variedade de alimentos, tais como produtos lácteos fermentados, pães, doces, confeitos, bebidas, etc., pois são mais estáveis que os FOS em condições de temperatura e acidez elevadas (SAKO *et al.*, 1999). Além disso, apresentam características físico-químicas e propriedades fisiológicas importantes e benéficas para a saúde dos consumidores. Entre estas propriedades destacam-se o baixo valor calórico, a atividade anticarcinogênica e a capacidade de estimular o crescimento de bactérias no cólon. Seu uso também está associado a um menor risco de infecções e diarreia e a uma melhoria da resposta do sistema imunológico. Devido à diminuição do pH intestinal causada por sua fermentação, os GOS provocam uma redução dos patógenos da flora, um aumento da população de bifidobactéria e da disponibilidade dos minerais (RIVERO-URGELL *et al.*, 2005; MUSSATTO e MANCILHA, 2007).

De acordo com Saad (2006), outra vantagem apresentada por estes compostos é o fato de não serem utilizados como substrato por *Streptococcus mutans*, o micro-organismo responsável pelo aparecimento das cáries. A ingestão de oligossacarídeos estimula a proliferação de *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* no intestino, ocasionando um considerável benefício à saúde humana (ALANDER *et al.*, 2001). Um outro benefício que resulta da transformação de lactose em galacto-oligossacarídeos é a produção de um leite com baixa concentração de lactose.

Tabela 2.5 - Galacto-oligosacarídeos disponíveis comercialmente.

	Fonte de β -galactosidase	Ligação Glicosídica	% Total de Açúcares GOS	Referências
Nissin sugar Mfg. Co. Ltd. Tokyo, Japan. http://www.nissin-sugar.co.jp				
CUP-oligo H-70 (Líquido)	<i>Cryptococcus laurentii</i>	β -(1→4)	~75	Tzortzis e Vulevic, 2009; Crittenden e Playne, 1996
CUP-oligo P (Pó)			~70	
Yakult Pharmaceutical Industry Co., Ltd. Tokyo, Japan. http://www.yakult.co.jp/yipi/en/origomate.htm				
Oligomate 55N (Líquido) / 55NP (Pó)	<i>A. oryzae/S. thermophilus</i>	β -(1→6)	>55	Spletchna <i>et al.</i> , 2006; Katta <i>et al.</i> , 2000
Oligomate 55N / 55P	<i>K. lactis/Sporobolomyces singularis</i>	β -(1→4/6)	-	Matsumoto <i>et al.</i> , 2004
TOS-100 (Pó)	<i>Bacillus circulans</i>	β -(1→4)	99	
FrieslandCampina Domo EMEA Amersfoort, The Netherlands. http://www.vivinalgos.com/				
Vivinal-GOS (Pó)	<i>Bacillus circulans</i>	β -(1→4)	~60	Tzortzis e Vulevic, 2009; Coulier <i>et al.</i> , 2009; Sinclair <i>et al.</i> , 2009.
Clasado Ltd. Milton Keynes, England. http://www.clasado.com/				
Bimuno (Pó)	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	β -(1→3)	52	Tzortzis e Vulevic, 2009; Silk <i>et al.</i> , 2009.
Corn Products Intl., Inc. (USA) http://www.cornproductsus.com/products/food-ingredients/health-and-wellness.php				
Purimune (Pó)	<i>Bacillus circulans</i>	β -(1→4)	≥90	-

Fonte: A autora.

A doçura relativamente baixa torna os oligossacarídeos úteis na produção de alimentos, quando um agente de volume com doçura reduzida é desejável para aumentar outros sabores/odores do alimento. No caso de alimentos muito doces, podem ser utilizados como agente de volume em conjunto com edulcorantes artificiais, como o aspartame ou sucralose, por exemplo, com a vantagem para disfarçar o sabor residual produzido por alguns edulcorantes. Além disso, quando comparado com mono e dissacarídeos, a maior massa molar dos oligossacarídeos proporciona aumento da viscosidade, produzindo alimentos mais encorpados (CRITTENDEN e PLAYNE, 1996).

As doses diárias efetivas de galacto-oligossacarídeos na forma pura são entre 2,0 a 2,5 g. Sua indigestibilidade se dá porque apresentam configuração β e as enzimas digestivas gastrointestinais humanas são, principalmente, específicas para ligação α . Isto faz os GOS resistentes à digestão e absorção no intestino permitindo que atinjam o ceco e o cólon, onde são fermentados por bactérias. O fato dos oligossacarídeos não serem digeridos pelos sucos digestivos humanos leva à comparação destas com as fibras, e os benefícios à saúde assemelham-se aos atribuídos às dietas ricas em fibras. Entretanto, não apresentam os efeitos físicos destas, como o aumento da viscosidade, e a contribuição ocorre devido às características fermentativas. As vantagens dos oligossacarídeos sobre as fibras estão em requererem menores doses recomendadas, serem levemente adocicados, não apresentarem textura e sabor desagradáveis, serem completamente solúveis em água, não se ligarem com minerais, serem fisicamente estáveis e mais fáceis de incorporar em alimentos e bebidas processados (TOMOMATSU, 1994).

Há uma ampla variedade de aplicações para os GOS como ingredientes a serem explorados na indústria de alimentos, permitindo agregar benefícios nutricionais e sensoriais a alimentos já existentes e novos produtos.

A projeção do segmento para ingredientes prebióticos, elaborada nos Estados Unidos, indica que este mercado está crescendo a uma taxa anual média de 5,2 %, de 2013 a 2019. O mercado foi avaliado em US\$ 11,16 bilhões de dólares em 2012, devendo alcançar US\$ 15,90 bilhões em 2019 (Transparency Market Research, 2014).

2.9.1 Condições para a Formação de GOS

Galacto-oligossacarídeos produzidos pela ação da enzima β -galactosidase sobre a lactose foram identificados pela primeira vez no início da década de 50. Quatro tipos de GOS foram formados utilizando β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* (ARONSON, 1952; PAZUR, 1954), e três tipos com β -galactosidase de *E. coli* (ARONSON, 1952). Desde então, vários estudos foram realizados para a síntese enzimática de GOS e diferentes resultados foram observados.

As principais conclusões obtidas foram as seguintes: (a) dependendo da fonte de β -galactosidase existem grandes diferenças entre a quantidade, o grau de polimerização e o tipo de galacto-oligossacarídeos formados (BOON *et al.*, 2000); (b) o aumento da concentração da enzima não é proporcional ao aumento da concentração de oligossacarídeos (CHOCKCHAIASAWASDEE *et al.*, 2005); (c) a concentração inicial de lactose é o fator mais importante que afeta a formação de GOS. Em concentrações baixas de lactose, a reação de hidrólise é predominante, enquanto a formação de GOS é observada em elevadas concentrações de lactose (ALBAYRAK e YANG, 2002). Zhou e Chen (2001) citam que, uma maior quantidade de GOS é obtida com maior concentração de lactose, pois numa solução de baixa concentração de lactose, a água é mais competitiva para ser um acceptor para o grupo β -galactosil, do que os açúcares presentes na solução. Os mesmos autores relataram um aumento na produção de GOS de 2 % a 32 % quando a concentração inicial de lactose aumentou de 14 a 40 % (m v⁻¹).

Nos trabalhos de Albayrak e Yang (2002) e Hsu *et al.*, (2007), os autores observaram que a formação de GOS é acompanhada por uma rápida diminuição da concentração da lactose no início da reação e, com o passar do tempo de reação, a concentração de GOS diminui, enquanto a concentração de galactose aumenta, indicando que transgalactosilação predomina no início da reação.

De acordo com López-Leiva e Gusman (1995), a fonte e concentração da enzima, o tempo de reação, a temperatura e o pH do processo, a concentração inicial de lactose e a presença de inibidores ou ativadores específicos para a enzima, têm influência sobre a quantidade de GOS formada.

Boon *et al.*, (2000) investigaram o efeito da temperatura e da origem da enzima na síntese de oligossacarídeos. Foram testadas várias temperaturas (20, 30, 40 e 50 °C) e foi usada a β -galactosidase de *Bacillus circulans*, *Aspergillus oryzae*, *Kluyveromyces lactis* e *Kluyveromyces fragilis*. O rendimento em oligossacarídeos foi ligeiramente mais elevado (24 mol L⁻¹) em temperaturas mais altas, sendo considerado uma vantagem adicional a influência da maior concentração inicial da lactose.

Chen *et al.*, (2003) verificaram que o rendimento total da produção em oligossacarídeos, utilizando a enzima β -galactosidase de *Aspergillus oryzae*, aumentava gradualmente com temperaturas de 35 – 47 °C, mas diminuía quando a temperatura excedia 47 °C, justificado por uma possível desnaturação da enzima.

Tabela 2.6 - Condições para formação de GOS a partir de β -galactosidase de leveduras, bactérias e fungos.

Fonte da Enzima	pH	Temp. °C	Lactose Inicial (g.L ⁻¹)	Máx. produção GOS %	Referência
Leveduras					
<i>Saccharomyces fragilis</i>	6,2	35	500	21,2	Manucci, 2009
<i>Kluyveromyces maxianus</i> var. <i>lactis</i> OE-20	7,0	40	200	13	Kim <i>et al.</i> , 2001
<i>Kluyveromyces lactis</i>	6,5	50	250	14,05	Martínez-Villaluenga <i>et al.</i> , 2008
<i>Kluyveromyces lactis</i>	6,5	50	400	31	Sanz Valero, 2009
<i>Kluyveromyces lactis</i>	8,0	40	352	35	Sun <i>et al.</i> , 2016
Bactérias					
<i>Saccharopolyspora rectivirgula</i>	7	70	600	41	Nakao <i>et al.</i> , 1994
<i>Sterigmatomyces elviae</i>	5,0	60	200	63	Onishi e Tanaka, 1995
<i>Thermus aquaticus</i> YT-1.	6,0	70	160	35	Berger <i>et al.</i> , 1995
<i>Rhodotorula minuta</i>	6,0	60	200	64	Onishi e Yokozeki, 1996
<i>Sterigmatomyces elviae</i>	4,5	60	360	60	Onishi e Tanaka, 1998
<i>Thermus</i> sp. Z-1	7	70	300	43	Akiyama <i>et al.</i> , 2001
<i>Escherichia coli</i>	6,7	37	220	29,7	Chen <i>et al.</i> , 2003
<i>Bullera singularis</i> KCTC 75	5	50	180	5	Cho <i>et al.</i> , 2003
<i>Thermotoga maritime</i>	6	80	500	39	Ji <i>et al.</i> , 2005
<i>Bifidobacterium bifidum</i> NCIMB 41171	6,8	40	400	43	Goulas <i>et al.</i> , 2007
<i>Bifidobacterium longum</i> BCRC 157	6,8	45	400	30,1	Hsu <i>et al.</i> , 2007
<i>Bacillus circulans</i>	6,0	40	400	40	Sanz Valero, 2009
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	6,5	55	430	44,1	Osman <i>et al.</i> , (2016)
Fungos					
<i>Aspergillus niger</i>	4,5	45	250	-	Wierzbicki e Kosikowski, 1972
<i>Aspergillus niger</i>	4,5	45	200	18,9	Kim <i>et al.</i> , 1990
<i>Aspergillus niger</i>	4,5	40	400	32	Iwasaki <i>et al.</i> , 1996
<i>Penicillium simplicissimum</i>	6,5	50	600	30,5	Cruz <i>et al.</i> , 1999
<i>Scopulariopsis sp</i>	5,5	45	400	22,6	Almeida, 2003
<i>Aspergillus oryzae</i>	4,5	55	200	17	Gaur <i>et al.</i> , 2006
<i>Penicillium expansum</i> F3	5,4	50	380	28,7	Li <i>et al.</i> , 2008
<i>Aspergillus Oryzae</i>	4,5	37	400	25	Sanz-Valero, 2009
<i>Aspergillus Oryzae</i>	4,5	40	500	26	Neril, 2008
<i>Aspergillus Oryzae</i>	4,5	40	400	21	Frenzel <i>et al.</i> , 2015

Fonte: A autora.

Chockchaisawasdee *et al.*, (2005) estudaram a síntese de galacto-oligossacarídeos de β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* (Maxilact® L2000) utilizando como substrato lactose. Para o estudo da síntese enzimática variaram a concentração de lactose de 220 a 400 mg mL⁻¹ e concentração de enzima de 3 a 9 U mL⁻¹ a 40 °C e pH 7. A máxima concentração de GOS (99 mg mL⁻¹) foi observada quando o sistema foi composto por 400 mg mL⁻¹ de lactose e 5,8 U mL⁻¹.

Santos (2006), com o propósito de avaliar o efeito da concentração de β -galactosidase na síntese de GOS, testou várias concentrações da enzima. Com as menores concentrações de enzima (0,5; 1 e 2 U mL⁻¹) ocorreu aumento gradativo da síntese de GOS. Nas concentrações mais elevadas (6 - 8 U mL⁻¹), o maior rendimento foi verificado em 24 h de reação, ocorrendo em seguida uma diminuição da produção. O mesmo autor estudou o efeito da concentração de lactose em três diferentes níveis (10, 25 e 40 %) para a produção de galacto-oligossacarídeos, a 40 °C e pH 4,5, utilizando β -galactosidase de *Scopulariopsis* sp. Observou que o aumento da concentração de lactose no meio influenciou a produção de GOS, alcançando a produção máxima de oligossacarídeos (80,8 mg mL⁻¹ de 4'galactosil-lactose) em 12 h de reação, com 40 % de lactose.

Alguns estudos avaliaram meios usando solvente aquoso/orgânico, sendo que os melhores resultados atingidos na literatura foram usando uma razão ciclohexano para a água de 95 : 5 (SHIN e YANG, 1994; BEDNARSKI e KULIKOWSKA, 2007). Shin e Yang (1994) relataram um aumento de 19 % no rendimento de GOS na presença de ciclohexano em relação ao sistema aquoso. No entanto, estes sistemas parecem inadequados para a produção em larga escala de GOS. As baixas atividades da água diminuem a taxa de reação e também a solubilidade dos carboidratos, como lactose (DONG *et al.*, 2015). Além disso, os solventes orgânicos reduzem a estabilidade da β -galactosidase (BEDNARSKI e KULIKOWSKA, 2007) e eles devem ser removidos do produto, implicando custo adicional do processo.

Nos trabalhos analisados, o rendimento de GOS foi de 13 a 35 % a partir de enzimas de leveduras em pH acima de 6,2 e temperatura entre 35 e 50 °C. Quando foram utilizados fungos, a produção de GOS foi de 17 a 32 % em pH entre 4,5 e 6,5 e temperatura entre 40 e 55 °C. Pelo menos três trabalhos citam que a produção de GOS foi de 60 a 64 % a partir das enzimas bacterianas em pH 4,5 a 6,0 e temperatura 60 °C (Tabela 2.6).

2.10 Enzimas Imobilizadas

A principal desvantagem da utilização de enzimas na forma solúvel, como catalisador industrial, é sua baixa estabilidade. Para resolver este problema, várias

abordagens têm sido propostas, tais como a imobilização de enzimas, o uso de glicóis e outros aditivos estabilizantes, a reticulação com agentes bifuncionais, a seleção de enzimas de organismos termófilos ou, ainda, modificações químicas na enzima (LADERO *et al.*, 2002; GIACOMINI *et al.*, 1998).

Enzimas imobilizadas são definidas (CHIBATA, 1978) como enzimas fisicamente confinadas ou localizadas em uma certa região de espaço com retenção de suas atividades catalíticas que podem ser usadas repetidamente e continuamente.

A imobilização de enzimas normalmente é necessária, pois esta permite numerosas vantagens, como, por exemplo (ZANIN e MORAES, 2014; GRUNWALD, 2009):

- a) A reutilização do biocatalisador;
- b) A redução do volume de reação, pois a enzima imobilizada pode ser utilizada em alta concentração em um menor volume de reator;
- c) A facilidade do controle operacional, pois operar de forma contínua possibilita um controle mais fácil das variáveis do processo;
- d) A fácil purificação do produto sem contaminação pelo catalisador, visto que a enzima imobilizada não é solúvel no meio de reação.

A perda de atividade catalítica é uma das grandes preocupações nos processos de imobilização. O decréscimo verificado na atividade catalítica pode ser causado pela possível desnaturação proteica da enzima durante o protocolo de imobilização, por alterações conformacionais que se verifiquem na estrutura secundária e por dificuldades na transferência de massa, no caso de métodos de oclusão (CABRAL *et al.*, 2003; CIPOLATTI *et al.*, 2014; GUZIK *et al.*, 2014). Por outro lado, a otimização das condições e metodologias de imobilização para os vários sistemas enzimáticos deve ser feita caso a caso, de forma empírica, tornando o controle e a modelação bastante complexos (CABRAL *et al.*, 2003).

2.10.1 Efeitos da Imobilização sobre as Propriedades Enzimáticas

Como já mencionado, as enzimas imobilizadas apresentam várias vantagens na sua aplicação quando comparadas às enzimas solúveis, porém, algumas alterações podem ocorrer nas suas propriedades físicas e químicas após a imobilização, implicando em mudanças na atividade, estabilidade e cinética da enzima imobilizada. Normalmente as enzimas imobilizadas mantêm sua atividade em condições de estocagem específicas de temperatura e pH. A estabilidade de estocagem das enzimas imobilizadas geralmente é superior à das solúveis, mas depende do método de imobilização do suporte e da solução a ser estocada (CHIBATA, 1978; BAGAL e KARVE, 2006).

A alteração no perfil de temperatura pode ser observada entre as enzimas imobilizadas, que pode ser causada pelos efeitos difusionais, mudanças conformacionais e efeitos estereoquímicos. Estas podem refletir em um aumento ou diminuição da temperatura ótima alcançada pela enzima imobilizada em relação à solúvel (EMBREGUL *et al.*, 2006; ZANIN e MORAES, 2014).

Considera-se que as alterações nas propriedades enzimáticas são causadas por dois fatores. Um é devido a mudanças na enzima em si e outro deve-se às propriedades físicas e químicas dos suportes usados na imobilização, como descreve-se a seguir:

- a) Inativação durante a imobilização: Pode ocorrer devido às altas temperaturas ou outras condições adversas durante o processo de imobilização. Em métodos de imobilização onde ocorre a ligação química, há o risco de que um grupo funcional pertencente ao sítio ativo da enzima faça parte da reação, o que normalmente resulta em perda de atividade (REED e NAGODAWITHANA, 1993; EMBREGUL *et al.*, 2006);
- b) Efeitos de transferência de massa: A taxa de uma reação química é influenciada pela cinética química e pelo efeito de transferência de massa. Quando as enzimas solúveis são usadas como catalisadores, as limitações difusionais são normalmente negligenciáveis, exceto quando o substrato está presente principalmente em outra fase, gasosa ou sólida. Todavia, quando as enzimas são ligadas ao suporte sólido, limitações de transferência de massa ocorrem frequentemente. A concentração de substrato na superfície da partícula de enzima imobilizada é normalmente diferente da concentração de substrato no seio da solução. Próximo à superfície está um filme líquido estagnante, ou uma camada limite, por meio dos quais substratos e produtos são transportados por difusão. As diferentes concentrações do filme estagnante são devidas às forças de difusão (REED e NAGODAWITHANA, 1993). Na imobilização em partículas porosas tem-se limitações de transferência de massa externa e interna à partícula. Estes efeitos de resistência à transferência de massa de substrato e produto, dependendo de sua extensão, podem constituir a etapa dominante do processo. Os parâmetros cinéticos determinados sem levar em consideração tais efeitos difusionais são normalmente denominados de aparentes e, via de regra, são diferentes daqueles determinados para a enzima na forma solúvel. Os parâmetros cinéticos aparentes são válidos apenas para a situação experimental na qual foram determinados. Os parâmetros cinéticos determinados na ausência de limitações difusionais são denominados intrínsecos (KHORASHEH *et al.*, 2002, OZDURAL *et al.*, 2003; ZANIN e MORAES, 2014);

- c) Alterações no valor do pH: Quando uma enzima é imobilizada, o pH ótimo pode ou não se alterar. As alterações no pH e na curva atividade/pH, dependem da carga da molécula da enzima e/ou suporte. Se o suporte é carregado, o comportamento cinético da enzima imobilizada pode diferir ao da enzima solúvel, mesmo na ausência de efeitos difusionais. Esse comportamento modificado pode ser atribuído ao fato de que as concentrações de espécies carregadas, tais como substrato, íons hidrogênio ou hidroxila, entre outros, no microambiente da enzima imobilizada, serem diferentes da solução externa, em razão das interações eletrostáticas com cargas fixas no suporte. Tais diferenças de concentração de espécies carregadas podem ser descritas pelo coeficiente de partição (ZHOU e CHEN, 2001; TANRISEVEN e DOGAN, 2002; GRUNWALD, 2009);
- d) Alterações da Temperatura: Na imobilização de enzimas, alterações na temperatura ótima de reação ocorrem em alguns casos. Essa pode ser maior do que a da enzima solúvel, em alguns casos, devido a efeitos difusionais, como por exemplo, no caso de oclusão e ligação a suportes porosos, que protege a enzima contra desnaturação térmica, uma vez que a temperatura no microambiente da enzima imobilizada é menor que na solução. Alterações conformacionais e efeitos estereoquímicos podem desempenhar um papel importante na tolerância da enzima à desnaturação química (GRUNWALD 2009; ZANIN e MORAES, 2014). Temperaturas ótimas da enzima imobilizada, menores e iguais à da enzima nativa também têm sido verificadas (ZANIN e MORAES, 2014). A interação no perfil de temperatura pode ser observada entre as enzimas solúveis e imobilizadas, o que pode ser causado pelos efeitos difusionais, mudanças conformacionais e efeitos estereoquímicos. Essas são capazes de refletir em um aumento ou diminuição da temperatura ótima alcançada pela enzima imobilizada em relação à solúvel (ZHOU e CHEN, 2001; TANRISEVEN e DOGAN, 2002; HAIDER e HUSSAIN, 2007);
- e) Especificidade em Relação ao Substrato: Quando a enzima é imobilizada, a sua atividade frequentemente decresce e a especificidade da mesma em relação ao substrato algumas vezes se altera, principalmente quando se trata de substratos de alto massa molecular, em virtude de alterações conformacionais na enzima e de efeitos estereoquímicos (CHIBATA, 1978; JURADO *et al.*, 2004);
- f) Energia de Ativação: A partir dos dados usados para obter o perfil de atividade/temperatura, é possível calcular a energia de ativação da reação catalisada pela enzima, solúvel ou imobilizada. A energia de ativação da

enzima imobilizada, em alguns casos é igual e em outros casos é menor do que aquela da enzima solúvel. Uma energia de ativação menor em relação à enzima solúvel indica a presença de resistência à difusão dos produtos e substrato, no caso das enzimas imobilizadas. A energia de ativação também depende do substrato, do suporte e do método de imobilização utilizado (ZANIN e MORAES, 2014).

Nas enzimas imobilizadas por métodos de ligação a suportes porosos ou por oclusão em géis e fibras, suas energias de ativação deveriam ser, teoricamente, menores do que as das correspondentes enzimas solúveis. Segundo Kennedy e Cabral (1987), há na literatura várias citações onde as energias de ativação das enzimas imobilizadas foram praticamente as mesmas das enzimas solúveis (ZANIN e MORAES, 2014), havendo também algumas citações de aumento das mesmas.

2.10.2 Métodos de Imobilização Enzimática

Muitos trabalhos, incluindo patentes, têm sido publicados sobre técnicas de imobilização de enzimas. Centenas de enzimas têm sido imobilizadas de diferentes formas e, aproximadamente uma dúzia delas (amino acilase, penicilina G acilase, lipases, proteases, nitrilase, amilase, invertase, β -galactosidase, CGTase, celobiase, entre outras) são cada vez mais usadas como catalisadores indispensáveis em muitos processos industriais (CAO, 2005; GUERRERO *et al.*, 2018). Embora os métodos básicos de imobilização possam ser categorizados em apenas alguns métodos, muitas variações baseadas em combinações desses métodos originais têm sido desenvolvidas (Figura 2.12) (KATZBAUER, 1995; GRUNWALD, 2009).

Embora existam muitas classificações de enzimas imobilizadas por métodos não covalentes, como, por exemplo, adsorção física não-específica; ligação iônica; coordenação (efeito quelante) e adsorção por afinidade, a imobilização não covalente de enzimas a um suporte pode ser classificada nas seguintes categorias (CAO, 2005):

- a) Adsorção física não-específica, na qual a enzima é adsorvida por forças não específicas, como van der Waals, ligação de hidrogênio e interações hidrofílicas;
- b) Adsorção bio-específica, normalmente utiliza ligantes para a adsorção de enzimas;
- c) Adsorção por afinidade em corantes ou metais imobilizados;
- d) Interação eletrostática (também ligação iônica), baseada na interação carga-carga entre o suporte e a enzima;
- e) Interação hidrofóbica, baseada na interação hidrofóbica entre regiões hidrofóbicas da enzima e do suporte.

Considerando enzimas solúveis e de acordo com Grundwald (2009), os métodos básicos possíveis de imobilização são:

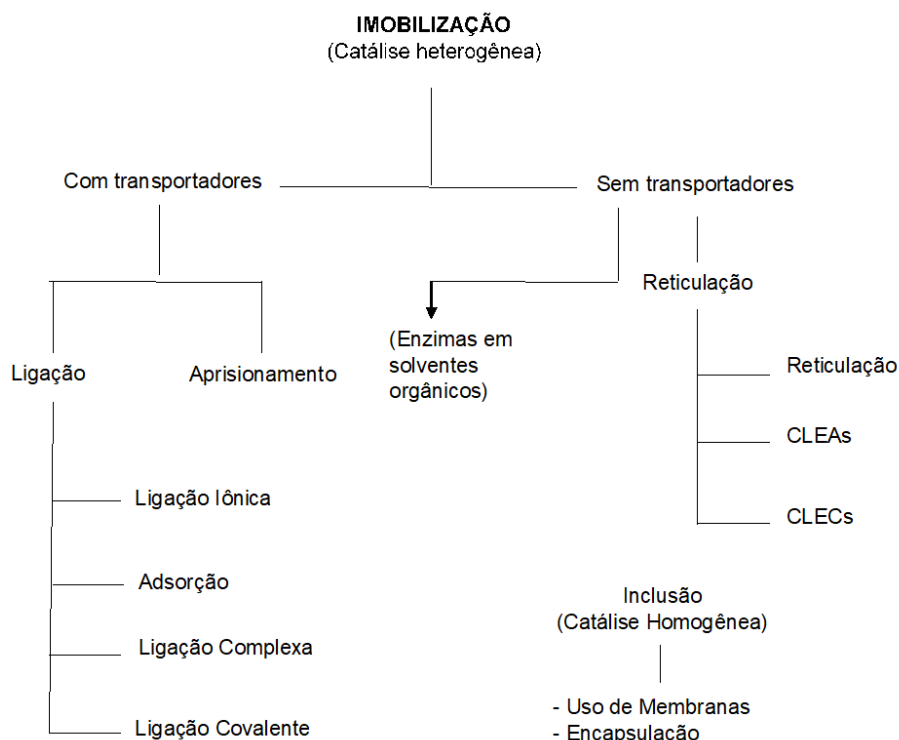


Figura 2.12 – Diferentes métodos de imobilização enzimática.

Fonte: Adaptado de Grundwald (2009).

Um exemplo de utilização do método de adsorção é a imobilização de β -galactosidase por adsorção física em cerâmica porosa, e entrecruzamento intermolecular com glutaraldeído, apresentando boa estabilidade operacional por até 135 dias de operação contínua (PAPAYANNAKOS *et al.*, 1993).

No que se refere à inclusão, as enzimas podem ser aprisionadas dentro da estrutura interna de alguns materiais (geralmente polímeros) na forma de géis, microcápsulas, fibras, filmes ou membranas. Um procedimento comum é preparar a solução contendo a enzima e o material polimérico e, na sequência, utilizar uma técnica (secagem, polimerização) para coagular o material polimérico contendo a enzima na forma desejada. Em alguns casos, a etapa de entrecruzamento adicional é necessária para garantir a imobilização (GEKAS e LÓPES-LEIVA, 1985; GRUNWALD, 2009).

Este método é geralmente aplicado a substratos de baixa massa molecular para permitir a livre difusão entre estes e os produtos. A maior desvantagem desta técnica é a possível perda de enzima, devido às suas pequenas dimensões moleculares, por meio da

difusão durante repetidos usos, mesmo que a matriz possua poros pequenos (GROSOVÁ *et al.*, 2008).

De acordo com Tanaka e Kawamoto (1999), a imobilização por inclusão pode ser classificada em cinco tipos: malhas, microcápsulas, lipossomas, membranas e micelas.

Para a imobilização de β -galactosidase, o método de malhas é o mais importante e o mais amplamente utilizado. A enzima é aprisionada dentro da matriz de vários polímeros sintéticos ou naturais. O alginato, um polissacarídeo de ocorrência natural, que forma géis por gelificação ionotrópica, é o polímero mais utilizado (GROSOVÁ *et al.*, 2008). Mammarella e Rubiolo (2005) imobilizaram β -galactosidase de *Klueyveromyces fragilis* em gel de alginato e carragena, formando esferas. A presença da *k*-carragena teve influência positiva na reação enzimática, uma vez que o gel é formado com íons K^+ que melhoram a atividade enzimática.

Outro método bastante utilizado de inclusão é pela utilização de matrizes de sílica sol-gel formada pela polimerização hidrolítica. Reetz e Jaeger (1998) usaram precursores alquilsilano ($RSi(OCH_3)_3$) ou combinações [$RSi(OCH_3)_4$] e $Si(OCH_3)_4$] para promover a inclusão da lipase de *Pseudomonas aeruginosa* na matriz sol-gel. Ajustando as condições de polimerização, alguns parâmetros como a porosidade do polímero, a rede estrutural e o tamanho de partícula podem ser modificados.

Similar à inclusão, a encapsulação protege a enzima do meio externo, porém, tem limitada aplicação, uma vez que substratos maiores estão sujeitos a limitações difusionais (LALONDE e MARGOLIN, 2002). Zhang *et al.*, (2008) desenvolveram um método de imobilização em camadas por inclusão e encapsulação, no qual a enzima β -glicuronidase foi misturada com carboximetilcelulose e $CaCl_2$. A solução foi gotejada em uma solução de alginato a 1 % (m/v). As cápsulas formadas foram deixadas reagir com protamina (pequena proteína rica em arginina) que, sendo muito grande para entrar na cápsula, foi ionicamente associada à superfície do alginato. A protamina precipitou os silicatos na superfície para formar uma casca rígida para as cápsulas, prevenindo seu inchaço ou compressão.

Já o entrecruzamento é a formação de uniões intermoleculares entre as enzimas, gerando ligações irreversíveis e agregados com conformação tridimensional. Estas ligações podem ser apenas entre as enzimas, ou entre a enzima e um segundo composto (chamada coentrecruzamento), como, por exemplo: a cristalização de enzimas e coentrecruzamento com albumina). O coentrecruzamento é indicado quando há efeitos difusionais causados pelo entrecruzamento. Neste caso, aplica-se, então, uma segunda proteína não enzimática como a albumina (ZANIN e MORAES, 2014). Para imobilização de β -galactosidase, o entrecruzamento é utilizado geralmente em combinação com outros métodos, principalmente adsorção e inclusão (GROSOVÁ *et al.*, 2008).

Por fim, a ligação covalente se caracteriza por ser o método mais utilizado para imobilização de β -galactosidase. Geralmente envolve dois passos, a ativação do suporte e a ligação da enzima ao suporte. Esta ligação ocorre entre um grupo nucleofílico (geralmente grupo amino), que está presente na enzima, e um grupo eletrofílico, que é formado no suporte após uma ativação adequada. O suporte deve possuir grupos livres como hidroxila, carboxila, amida ou amina, ou então deve ser modificado para a introdução de tais grupos que devem ser ativados para posterior imobilização da enzima (GEKAS e LÓPES-LEIVA, 1985).

Comparada a outras técnicas, a imobilização covalente de enzimas tem as seguintes vantagens: a enzima não desorve do suporte, interage facilmente com o substrato desde que esteja na superfície do suporte. Por outro lado, a maior desvantagem são os altos custos e, em alguns casos, o baixo rendimento, devido à exposição da enzima a reagentes tóxicos ou condições severas de reação (TANAKA e KAWAMOTO, 1999).

Existem muitos procedimentos para estabelecer ligações covalentes entre a enzima e o suporte. Algumas classes de reações utilizadas são (ZANIN e MORAES, 2014; CAO, 2005): diazotização, formação de ligação amida (peptídica), alquilação ou arilação, formação de base de Schiff, reação de Ugi.

A estabilidade da enzima pode ser aumentada se a imobilização covalente ocorrer em suportes altamente ativados, com espaçadores curtos, e envolvendo múltiplos resíduos de aminoácidos na superfície da enzima (Figura 2.13). Esta ligação covalente multipontual promove a rigidificação da estrutura da enzima imobilizada e reduz mudanças conformacionais envolvidas na sua ativação (MOZHAEV *et al.*, 1990, ZANIN e MORAES, 2014). Embora a imobilização possa ser feita em valores neutros de pH, a incubação em pHs alcalinos, em que a reatividade dos nucleófilos da proteína (geralmente lisina) pode ser aumentada, é conveniente para alcançar uma intensa reação entre a enzima e o suporte. Deve-se ter em mente que, enquanto o pK dos grupos amino terminais da proteína é entre 7 e 8, os grupos de Lis expostos terão um pK acima de 10,5 (MATEO *et al.*, 2007a). Além disso, a imobilização por grupos epóxi do suporte é geralmente utilizada, uma vez que tais grupos são relativamente estáveis, podem se ligar à lisina e reagem em condições moderadas (MATEO *et al.*, 2007a).

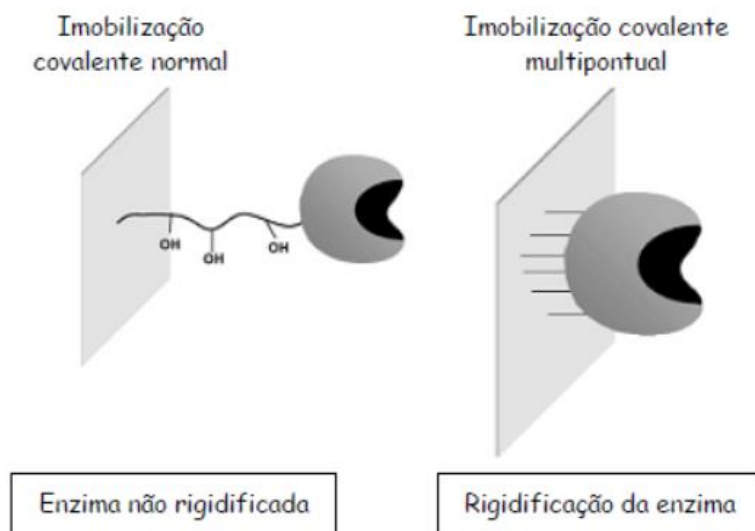


Figura 2.13 - Efeito da imobilização na estabilidade da enzima.

Fonte: Adaptado de Mateo *et al.*, (2007b).

Como exemplo de ligação covalente, pode-se citar a imobilização de β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* em placas de grafite, pela formação da base de Schiff entre grupos ativados da superfície do suporte e a enzima, utilizando glutaraldeído para promover o entrecruzamento. A imobilização aumentou a estabilidade térmica e deslocou o pH ótimo para valores mais alcalinos (7,7) comparada com a enzima solúvel (6,6) (ZHOU e CHEN, 2001).

2.10.3 Suportes para Imobilização

De modo correspondente às várias técnicas de imobilização de enzimas existentes, muitos suportes têm sido desenvolvidos para este fim. Mesmo não existindo um suporte universal existem certas características a serem consideradas para a sua escolha (LASKIN, 1985; ZANIN e MORAES, 2014; GRUNWALD, 2009):

- a) Estabilidade frente aos parâmetros de processo e ataque microbiano;
- b) Funcionalidade química;
- c) Durabilidade e capacidade de reutilização;
- d) Elevada área específica e alta porosidade;
- e) Compatibilidade aceitável com a enzima e substrato;
- f) Tamanho e forma adequados;
- g) Custo;
- h) Facilidade de manuseio.

Para se obter uma imobilização eficiente é indispensável conhecer previamente as características da enzima, do suporte e das possíveis interações entre eles. Se a interação da enzima com o suporte não for estável o suficiente, pode vir a ocorrer, por exemplo, perda de enzima para o meio, ao longo do processo. Ou ainda, se a afinidade da enzima com o suporte for maior do que com o substrato, a eficiência do processo estará comprometida (LASKIN, 1985; ZANIN e MORAES, 2014; GRUNWALD, 2009).

Os suportes sólidos podem ser classificados como orgânicos e inorgânicos, porém esta classificação não é muito adequada, pois não se considera nem a área superficial e nem o tamanho dos poros, propriedades que afetam consideravelmente a carga proteica do suporte. Assim, baseando-se em sua morfologia, os suportes podem ser classificados como: suportes não-porosos e suportes porosos (CABRAL e KENNEDY, 1991; ZANIN e MORAES, 2014).

Os suportes não-porosos geralmente apresentam mais desvantagens do que vantagens. A sua área específica é muito baixa e, portanto, está limitada a área de imobilização. Para aumentar esta superfície, pode-se trabalhar com partículas muito finas, porém, com a desvantagem de ser difícil a sua separação do sistema, e de não poder trabalhar em sistemas contínuos do tipo coluna, uma vez que não suportam altas pressões sem se compactar, nem em leitos fluidizados, pois está limitada a velocidade de fluxo. Possuem, ao contrário, a vantagem de não apresentarem problemas difusionais, uma vez que a enzima é imobilizada na superfície externa do suporte.

Os suportes porosos apresentam, por sua vez, uma grande área específica por unidade de massa, o que aumenta sua capacidade de imobilização. A principal desvantagem é que a maior área disponível é a interna e, por isso, aumentam os problemas de difusão. Para superar tais problemas, existem suportes de poro controlado, de forma que é possível selecionar o suporte mais adequado de acordo com o tamanho da enzima, substrato e produto. De modo geral, os poros de determinado suporte devem ser da mesma ordem de grandeza da enzima ou maior, para que a mobilidade da enzima não seja significativamente diminuída (CAO, 2005; ZANIN e MORAES, 2014). Em um amplo estudo realizado por Artyomova *et al.*, (1986), a máxima capacidade para a imobilização de várias enzimas e proteínas foi obtida quando o tamanho do poro das sílicas utilizadas como suporte excederam de 5 a 10 vezes o tamanho do glóbulo proteico.

Muitos suportes porosos podem ser classificados como géis. Por serem elásticos, podem assumir a conformação mais adequada (membranas, partículas), porém seus poros são deformáveis e se compactam em altas pressões. Além disso, os suportes podem também ser classificados como orgânicos e inorgânicos (HULTIN, 1983; CABRAL e KENNEDY, 1991; ZANIN e MORAES, 2014). Alguns exemplos de suportes orgânicos:

- a) Polímeros naturais: polissacarídeos, como celulose, amido, ágar, agarose, alginatos, carragena, quitosana, etc.
- b) Polímeros sintéticos: poliestireno, poliacrilatos, poliacrilamida, álcool polivinílico, poliamidas, etc.
- c) Proteínas: colágeno, albumina, gelatina, seda, queratina, etc.

Exemplos de suportes inorgânicos:

- a) Minerais: bentonita, pedra pomes, areia, titânio, celite, etc.
- b) Manufaturados: óxidos metálicos, vidro de porosidade controlada, cerâmicas, géis de sílica, etc.

Dentre os suportes orgânicos, a kappa-carragena, quitosana, e alginato são indicados por seu baixo custo, segurança e bom potencial de uso, apesar de apresentarem baixa resistência mecânica. O alginato é uma das matrizes orgânicas mais empregadas, conforme citações de Hulst e Tramper (1989) e Cheetam (1979). Nestes mesmos trabalhos são apresentadas as vantagens de sua utilização: baixo custo, fácil manuseio, boa reprodutibilidade e uniformidade de gel. Entretanto, a sua principal desvantagem também é apresentada: o decréscimo de sua estabilidade mecânica com o tempo de uso (BRUKE, 1984).

A celulose é um polímero natural que também tem sido relatado como um atrativo suporte para a imobilização de enzimas, uma vez que é atóxico, biocompatível, é geralmente obtido de fontes renováveis, possui boas propriedades mecânicas e é susceptível a funcionalização química (VIGO, 1998).

Os suportes inorgânicos são bastante adequados para imobilização de enzimas, pois permitem maior variação de parâmetros de processo em razão da sua maior resistência química, física, térmica e microbiológica. Gaspari *et al.* (1999) imobilizaram a enzima inulinase em diferentes suportes, como quitina, alginato de sódio e de cálcio, membrana de diálise e sílica de porosidade controlada. A sílica de porosidade controlada apresentou os melhores resultados em virtude de uma maior estabilidade e resistência física comparada aos outros suportes avaliados.

2.10.3.1 Sílica

O silício é o segundo elemento mais abundante na crosta terrestre, perdendo apenas para o oxigênio. Está presente em vários tecidos, animais e vegetais, sendo essencial para alguns organismos. Este elemento pode apresentar-se na forma de óxidos cristalinos (quartzo, cristobalita, tridmita, coesita) e não-cristalinos (sílica vítrea, opala e sílica gel). Em um ambiente natural, apresenta-se na forma de óxido (SiO_2) ou combinado

com outros elementos – por exemplo, sódio, potássio, magnésio – formando os silicatos (ILER, 1979; FARIAS e AIROLDI, 2000).

Frondel (1962) afirmou que a sílica não cristalina é, na verdade, constituída por regiões, de ordem atômica, nas quais apresentam-se cristais bastante pequenos que, quando analisados cuidadosamente por difratometria de raios X, podem-se observar picos referentes à estrutura cristobalita do SiO_2 . Todavia, em análises regulares de difratometria de raios X, observa-se apenas um halo largo de difração caracterizando-a como “não cristalina” ou “amorfa”.

A sílica não-cristalina pode ser dividida em três grupos (ILER, 1979):

- a) Sílica vítrea;
- b) Sílica M, sendo produzida a partir da irradiação de nêutrons em alta velocidade, em sílica amorfa ou cristalina. Essa forma é termicamente instável, sendo convertida a quartzo a $930\text{ }^\circ\text{C}$ em 16 horas;
- c) Sílica “microamorfa”, como sóis géis, pós e vidros porosos. Englobam-se partículas menores do que $1\text{ }\mu\text{m}$ ou com área superior a $3\text{ m}^2\text{ g}^{-1}$.

A classe de sílica “microamorfa”, constituída por partículas com diâmetro inferior a 100nm, é aquela mais facilmente sintetizada em laboratório, principalmente via método sol-gel.

As partículas são formadas a partir do enovelamento das cadeias do polímero inorgânico ácido polissilícico, cujas unidades repetitivas (grupos SiO_4 tetraédricos) se distribuem tridimensionalmente, ligando-se por ligações siloxano (ligações Si-O-Si). Deste modo, observa-se em sua superfície grupos SiO_2 e Si-OH, sejam livres ou geminais (Figura 2.14) (ZANIN e MORAES, 2014).

A reatividade química é determinada, principalmente, pelos grupos silanóis presentes na superfície da sílica. A primeira constante de dissociação (pKa) do ácido silícico (H_4SiO_4) é 9,6 (2,5). Já o valor de pKa dos grupos silanóis (enésima dissociação) presentes na sílica é de, aproximadamente, 7.1 (HAIR e HERLT, 1970). Como para ácidos prolióticos, a sílica apresenta diversas constantes de dissociação, sendo que tal grandeza varia em função da ionização das hidroxilas. A dissociação de tais grupos pode ser controlada pelo pH do meio em que as partículas se encontram suspensas. Em pH (ponto isolelétrico, i.e., o valor de pH no qual as partículas apresentam carga superficial zero, o pKa da sílica é 6,5. Quando se dissocia cerca de 50% dos grupos silanóis, o pKa aumenta para 9,2, aproximando-se do valor referente ao ácido silício (ILER, 1979). Portanto, em seu ponto de carga zero (pH 2), a sílica apresenta caráter mais ácido do que o ácido silícico, sendo este diminuído em função dos grupos silanóis, que é conseguido elevando-se o pH do meio de suspensão das partículas.

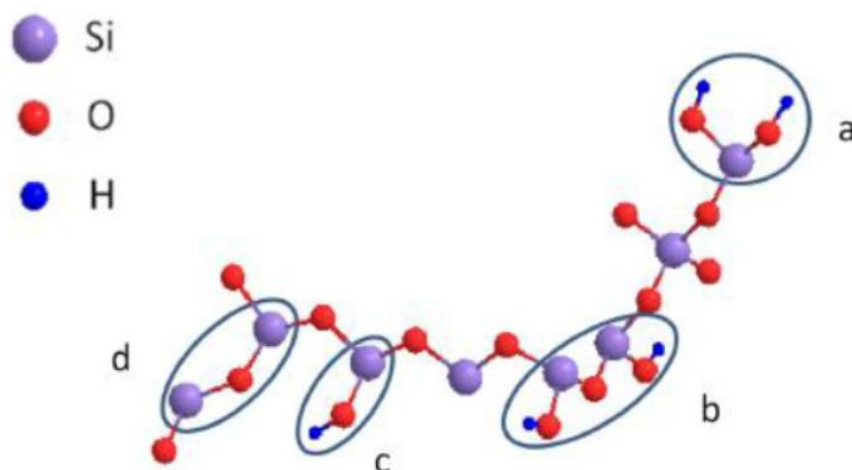


Figura 2.14 - Esquema da superfície da sílica: (a) silanóis geminais, (b) vicinais, (c) isolados, (d) siloxanos.

Fonte: Adaptado de Vansant *et al.*, (1995).

As hidroxilas presentes na superfície da sílica são passíveis de serem quimicamente modificadas, resultando na funcionalização da superfície da sílica. Tais reações possibilitam a obtenção de matrizes de sílica mais seletivas e versáteis, uma vez que incorporam as características dos agentes modificadores (TORRES *et al.*, 2010).

2.10.3.2 Modificação da Superfície da Sílica

A sílica é um sólido muito versátil que pode ser trabalhado (modificado) de forma que apresente as propriedades físico-químicas desejadas. Na prática, a maioria das aplicações da sílica a requer modificada.

Para El Shafei (2000), a heterogeneidade inicial da superfície da sílica pode ser minimizada pela adição de modificadores simples. Quando a modificação possui a capacidade de reagir com mais de um silanol, a superfície se torna ainda mais complexa.

Segundo Jal *et al.* (2004), a modificação da superfície da sílica pressupõe a alteração da sua composição química. A modificação pode resultar de um processo físico (térmico ou hidrotérmico) ou da incorporação de espécies inorgânicas (YAMADA *et al.*, 1998; ORTEGA-ZARZOSA *et al.*, 2002) ou orgânicas na superfície da sílica.

Um dos métodos que tem sido amplamente usado na modificação da sílica é o processo chamado de silanização. Este método consiste na cobertura de uma superfície por meio de automontagem com moléculas de alcoxissilanos organofuncionais. A diversidade de materiais passíveis de silanização é enorme, dentre eles, os componentes minerais como superfícies de mica, de vidro e de óxido de metal. Tal capacidade surge da

existência de grupos hidroxilas com capacidade de atacar e deslocar os grupos alcoxi do silano, formando, assim, uma ligação covalente -Si-O-Si. O objetivo desta reação é formar ligações entre os componentes minerais e componentes orgânicos (SEED, 2001). O uso de precursores de sílica orgânicos funcionais não são novidade em trabalhos publicados e suas propriedades hidrofóbicas ou hidrofílicas sempre foram muito estudadas para diversas aplicações (ARAUJO *et al.*, 1995; HALLIWELL e CASS, 2001).

Em teoria, o mecanismo da reação de sinalização parece relativamente simples. Primeiro ocorre hidrólise dos grupos alcóxidos ligados ao grupo funcional precursor de sílica, e depois esses grupos ligam-se covalentemente aos grupos hidroxilas na superfície do material. Entretanto, na realidade, a situação é mais complicada e o método exato de modificação ainda não foi totalmente compreendido (HALLIWELL e CASS, 2001).

O controle da densidade de grupos silanóis ligados na superfície, tende a ser proporcional ao número de alcóxissilanos hidrolisáveis (HALLIWELL e CASS, 2001), então, a redução do número de grupos hidrolisáveis nos precursores de sílica pode ser uma forma de aumentar a densidade de grupos funcionais hidroxila na superfície, que pode, por sua vez, ser regenerada pela ação de base forte, pois essa cliva as ligações, gerando hidroxilas tanto na superfície do material como nos grupos funcionais.

Alguns materiais exigem uma etapa anterior de preparação: a ativação da superfície, para que a reação de sinalização ocorra. Tal necessidade surge devido à ausência de grupos funcionais quimicamente reativos na superfície dos substratos, geralmente associada ao processo de secagem dos materiais que serão modificados. Caso a remoção de água tenha sido conduzida de forma abrupta, há remoção dos grupos hidroxilas da superfície do material e, assim, exige-se um processo de ativação de superfície para criar sítios reativos sobre eles. Os métodos de ativação basicamente utilizam ácidos e peróxidos para oxidar a superfície e promover a reconstituição dos grupos hidroxilas nos materiais (RUCKENSTEIN e LI, 2005).

Em outros casos, os grupos funcionais devem ser modificados para produzir intermediários reativos, sendo que o reagente mais utilizado neste caso é o glutaraldeído, devido à simplicidade do método e obtenção de preparações enzimáticas ativas e estáveis (KENT *et al.*, 1978; KENEEDY e WHITE, 1985).

A ativação com glutaraldeído forma grupos aldeídos no suporte ativado, que irão reagir com grupos aminos da enzima por meio de ligações covalentes instáveis (bases de Schiff). Embora seja o método de ativação mais utilizado em imobilizações de enzimas, ele apresenta alguns problemas, tais como: moléculas de enzima podem ser imobilizadas neste tipo de suporte com diferentes orientações, tornando o sítio ativo de algumas delas inacessível para grandes substratos (Tardioli *et al.*, 2003 a e b); podem ser formadas múltiplas camadas de enzima e/ou aglomerações excessivas das moléculas no interior dos

poros, dificultando o acesso ao sítio ativo (Sobral *et al.*, 2002 e 2003); produzem derivados que são poucas vezes mais estáveis que a enzima solúvel; e a alta reatividade e instabilidade dos grupos reativos, que requerem rápido contato com a enzima, não permitindo estocagem prolongada do suporte ativado.

A ativação do suporte com grupos aldeídos usando glicidol (2,3-epoxi-propanol) como reagente bifuncional, vem sendo amplamente usada desde 1987. Este método de ativação gera aldeídos alifáticos altamente estáveis, permitindo que o suporte ativado seja estocado por tempo prolongado (1 ano a 4 °C), e reaja, em pH alcalino, com grupos aminos desprotonados dos resíduos de lisinas da molécula de enzima, possibilitando a formação de várias ligações covalentes enzima-suporte. Os grupos aldeídos ativos (glioil), por estarem moderadamente afastados da superfície do suporte (braço espaçador curto), tornam a molécula de enzima imobilizada muito mais rígida e, por conseguinte, muito mais resistente à inativação induzida por altas temperaturas, solventes orgânicos e outros agentes desnaturantes (GUISÁN, 1988). Uma das grandes vantagens em se utilizar suportes ativado com grupos glioil na imobilização de enzimas é a de que as ligações entre os grupos aminos da enzima e os grupos aldeídos do suporte provocam uma mínima distorção da estrutura tridimensional da proteína, rendendo derivados com alta retenção da atividade catalítica (GUISÁN, 1988).

2.10.4 Modificações na Enzima Pós-imobilização

Por muitos anos, a modificação química de enzimas foi utilizada como uma técnica fundamental para elucidar os resíduos envolvidos na atividade catalítica. A modificação química tem sido usada também como uma ferramenta em bioquímica aplicada, por exemplo, na estabilização de enzimas pela modificação dos resíduos chaves, pelo intercruzamento molecular (ZANIN e MORAES, 2014). Do ponto de vista da bioquímica aplicada, a modificação química continua sendo uma excelente forma de abordagem para o melhoramento da engenharia de imobilização e estabilização de enzimas e modulação das suas propriedades catalíticas, sendo, ainda, uma técnica complementar adicional para a melhoria das propriedades de enzimas geneticamente modificadas (ZANIN e MORAES, 2014).

Reagentes macromoleculares polifuncionais de cadeia longa e hidrofílico, como glutaraldeído e polialdeído dextrana, podem ser usados para modificar quimicamente a superfície de enzimas para obter as seguintes vantagens, segundo Zanin e Moraes (2014):

- a) Produção de ligações cruzadas por meio de um grande número de grupos reativos a diferentes distâncias na superfície da enzima;

- b) Estabilização da enzima pela restrição da mobilidade de sua superfície aumentando assim sua resistência ao desnovelamento e dissociação das subunidades;
- c) Estabilização da enzima pela cobertura de grupos hidrofóbicos da superfície da enzima;
- d) Estabilização da enzima pela criação de uma barreira resistente ao ataque de reagentes químicos, solventes ou outros agentes apolares.

A ligação cruzada de subunidades e a geração de ambientes artificiais ao redor da superfície da enzima são duas fortes características desta abordagem. A modificação das propriedades da superfície da enzima, tais como mudanças nas cargas, na hidrofobicidade e interações com meios diferentes podem causar dramáticos efeitos nas propriedades da enzima (ZANIN e MORAES, 2014).

2.10.5 Propriedades Catalíticas da Enzima Solúvel e Imobilizada

2.10.5.1 Influência do pH na Atividade e Estabilidade das Enzimas

O pH também exerce grande influência na atividade e estabilidade das enzimas. Os vários aminoácidos que compõem a proteína possuem grupos laterais básicos, neutros ou ácidos, portanto a enzima pode ser carregada positivamente ou negativamente, dependendo do pH. Tais grupos ionizáveis são frequentemente parte do sítio ativo, já que um mecanismo catalítico ácido-base está ligado à catálise enzimática. Assim, a enzima para estar cataliticamente ativa só existe um estado particular de ionização. Dessa forma, a enzima ativa será uma fração maior ou menor de concentração total da enzima, dependendo do pH. A taxa da reação aumenta com o pH até um valor ótimo, a partir do qual a taxa decresce, ou devido à desnaturação ou à existência de estados de ionização inadequados (ZHOU e CHEN, 2001; DAVID *et al.*, 2006). O efeito do pH nas reações enzimáticas se deve à ionização do substrato e resíduos de aminoácidos das enzimas. Esses efeitos são manifestados como mudanças na atividade catalítica das enzimas, estabilidade, interações com ligantes, ou mudanças no equilíbrio da reação (REED e NAGODAWITHANA, 1993).

O pH, ou faixa de pH de maior estabilidade da enzima, depende de muitos fatores, tais como temperatura, força iônica, natureza química do tampão, concentração de vários preservativos, concentração de substrato, cofatores e concentração de enzimas. Em muitos casos, o substrato pode induzir à mudança conformacional da enzima para uma forma que é mais resistente ou menos resistente ao pH e à temperatura de desnaturação. Os sítios ativos das enzimas são frequentemente compostos por grupos inionizáveis, que se encontram numa forma iônica adequada ao ligar ao substrato ou catalisar uma reação.

Os efeitos do pH na estabilidade de uma enzima devem ser levados em conta em qualquer estudo do efeito do pH na ligação do substrato e na catálise. A queda na atividade das enzimas pode ser devido à consequência da desativação das enzimas ou combinação desses efeitos (SEGEL, 1993).

A ação catalítica de uma enzima numa reação enzimática é alcançada dentro de limites muito estreitos de pH. No entanto, se uma enzima atua sobre mais de um substrato, os valores de pH ótimo variam. A faixa de pH de maior atividade das lactases pode variar de 2,0 até 10,0 e muitas atuam em pH próximo do neutro, como no caso da β -galactosidase de *Kluyveromices fragilis*. A mesma enzima isolada de fontes diferentes pode exibir valores diferentes de pH ótimos, provavelmente refletindo a necessidade fisiológica do organismo a partir do qual a enzima foi isolada (REED e NAGODAWITHANA, 1993), como observado na Tabela 2.3. Além disso, a técnica pela qual as preparações enzimáticas são elaboradas, como, por exemplo, o tampão utilizado, podem influenciar diretamente em suas propriedades.

2.10.5.2 Influência da Temperatura na Atividade e Estabilidade das Enzimas

Na maioria das reações químicas ocorre o aumento da sua velocidade com a elevação da temperatura. Um aumento na temperatura implica maior energia cinética às moléculas de reagente, ocasionando um maior número de colisões produtivas por unidade de tempo. As reações catalisadas por enzimas se comportam, até certo ponto, de forma semelhante às outras reações (ZHOU e CHEN, 2001).

A velocidade das reações enzimáticas aumenta com a temperatura, até atingir uma velocidade máxima, a partir da qual começa a decrescer. Sob condições específicas, a temperatura ótima para cada reação pode ser determinada, o efeito da temperatura é muito complexo e pode ser devido à várias causas. Inicialmente, com o aumento da temperatura, a atividade molecular é aumentada, contribuindo, conseqüentemente, para a formação do complexo enzimático. No entanto, com o aumento contínuo da temperatura, poderá ocorrer a desnaturação da enzima, até a inativação total ocasionado pelo rompimento da estrutura terciária da proteína (SEGEL, 1993; ZHOUL e CHEN, 2001; HAIDER e HUSSAIN, 2007).

A melhor temperatura de operação é a temperatura máxima, na qual a enzima possui uma atividade constante por um longo período de tempo. Essa temperatura pode ser facilmente estabelecida pela pré-incubação da enzima em várias temperaturas, determinando-se posteriormente a atividade residual em condições padrão. A temperatura de melhor operação da enzima depende de outros fatores como pH, força iônica do meio e presença ou ausência de ligantes (SEGEL, 1993).

2.10.5.3 Energia de Ativação da Reação

Uma reação química, tal como substrato passando a produto, ocorre porque uma determinada fração da população de moléculas de substrato, em um instante qualquer, possui energia suficiente para atingir uma condição ativada, denominada “estado de transição”, no qual a probabilidade de que uma ligação química se forme ou se rompa para atingir o produto é elevada. Esse estado de transição está no alto da barreira energética que separa os reagentes e os produtos. A velocidade de uma determinada reação química é proporcional à concentração dessa espécie de estado de transição. A energia de ativação é a quantidade de energia necessária para levar todas as moléculas, em um mole de substância, a uma temperatura determinada, à condição de transição no ponto mais elevado da barreira de ativação (LEHNINGER, 2014).

Há duas maneiras de aumentar a velocidade de uma reação. Uma delas consiste em aumentar a temperatura e a outra em abaixar a energia de ativação. As enzimas são catalisadores biológicos, que abaixam seletivamente as energias de ativação das reações químicas vitais. Uma reação catalisada por uma enzima, pode se processar a 25 °C, 10⁶ a 10⁵ vezes mais rapidamente que a mesma reação não catalisada (SEGEL, 1993; ZANIN e MORAES, 2014).

O efeito da temperatura sobre uma reação enzimática, pode ser analisado com o auxílio da equação de Arrhenius. Esta equação relaciona a velocidade de uma reação e a energia de ativação, em que o logaritmo da atividade ou da velocidade é plotado em função do inverso da temperatura absoluta (SEGEL, 1993; ZANIN e MORAES, 2014):

$$V = A * \exp\left(-\frac{E_A}{RT}\right) \quad (2.1)$$

Em que: A = constante de Arrhenius; E_A = energia de ativação da reação; R = constante da lei dos gases (8,314 J K⁻¹ mol⁻¹); T = temperatura absoluta (K); V = velocidade da reação.

2.10.5.4 Energia de Desnaturação Térmica

A desnaturação proteica, ou seja, a energia de desnaturação, pode ser obtida de maneira análoga à obtenção da energia de ativação (ZANIN e MORAES, 2014). A partir dos dados de estabilidade térmica obtidos incubando-se a enzima por um certo período de tempo, em condições pré-determinadas, e dosando-se sua atividade após cada intervalo de incubação. Em relação à concentração de enzima ativa, a velocidade de desnaturação

é de primeira ordem, segundo a maioria dos trabalhos realizados nesta área, e segue a lei de Arrhenius. A partir desta hipótese, a velocidade de desnaturação da β -galactosidase pode ser representada pela equação:

$$V_D = -K_D * E \quad (2.2)$$

$$K_D = K_D^0 * \exp\left(-\frac{E_D}{RT}\right) \quad (2.3)$$

Em que: E = concentração da enzima ativa; E_D = energia de desnaturação térmica da enzima; K_D = constante de desnaturação térmica da enzima em uma determinada temperatura, modelo exponencial (h^{-1}); K_D^0 = fator exponencial (h^{-1}); V_D = velocidade de desnaturação térmica da enzima.

Fazendo-se um balanço material para um determinado reator em relação a enzima, com posterior integração tem-se:

$$E = E_0 * \exp(-K_D * t) \quad (2.4)$$

Em que: E_0 = concentração inicial da enzima ativa; t = tempo de reação.

Segundo Dixon e Webb (1979), a quantidade de enzima ativa é diretamente proporcional à atividade enzimática, portanto tem-se:

$$\frac{E}{E_0} = \frac{A_i}{A_{i0}} \quad (2.5)$$

Em que: A_i = atividade enzimática residual observada no reator, após certo período de encubação; A_{i0} = atividade enzimática inicial observada no reator sem encubação da enzima.

A relação entre a atividade inicial e a residual, num determinado período de tempo, é do tipo exponencial:

$$A_i = A_{i0} * \exp(-K_D * t) \quad (2.6)$$

A partir das curvas de $\ln(A_i/A_{i0})$ em função do tempo, pode-se obter o valor da constante de desnaturação (K_D) para uma determinada temperatura. Observa-se que, quanto mais elevada a temperatura, maior o valor de K_D .

A energia de desnaturação da enzima pode ser calculada pela equação (2.3) e a partir do gráfico do logaritmo de K_D em função do inverso da temperatura absoluta.

O tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) é outra característica importante da estabilidade enzimática. Ele representa o tempo necessário para que a atividade seja reduzida à metade do seu valor inicial, num determinado conjunto de condições. Se a atividade decresce de acordo com a equação (2.6), há uma relação inversamente proporcional entre o tempo de meia-vida e o coeficiente de desnaturação térmica:

$$t_{\frac{1}{2}} = \frac{\ln 0,5}{(-K_D)} = \frac{0,693}{K_D} \quad (2.7)$$

As enzimas são muito mais ativas a baixas temperaturas, e desnaturadas a temperaturas mais elevadas, pois existe uma diferença de grandeza entre a energia de ativação e desnaturação. A energia de desnaturação da maioria das enzimas normalmente encontra-se entre 47 e 96 kcal mol⁻¹, sensivelmente maior que a energia de ativação que geralmente é inferior a 25 kcal mol⁻¹ (DIXON e WEBB, 1979; ZANIN e MORAES, 2014).

2.10.5.5 Estabilidade Operacional

Na indústria, a estabilidade operacional é um dos fatores de maior importância, pois algumas enzimas são essencialmente instáveis e tornam-se rapidamente inativas.

Os fatores que estabilizam e inativam as enzimas não são bem conhecidos. Uma enzima proveniente de um microrganismo termófilo pode ser excepcionalmente estável ao calor ou outras propriedades desnaturantes. Um exemplo é a β -galactosidase de *Streptococcus thermophilus*. Esta enzima, segundo Greenberg e Mahoney (1982), é mais estável que a β -galactosidase de *Kluyveromyces fragilis* e *Kluyveromyces lactis*, sendo de extrema importância para a indústria devido à sua resistência térmica.

De um modo geral, o processo de imobilização aumenta a estabilidade operacional da enzima em relação à enzima solúvel. Isto pode ser um artifício provocado pelas limitações difusionais, que faz com que somente uma fração da enzima imobilizada seja ativa no início do processo, permanecendo a restante como reserva, que somente começará a atuar quando a atividade inicial estiver desnaturada (ZANIN e MORAES, 2014).

A contaminação microbiológica ou entupimento do reator, pode resultar numa abrupta perda de atividade, por isso é importante determinar a estabilidade da enzima imobilizada nas condições de operação, e por um período de tempo suficientemente longo, em vez de se cometer excessos a partir de curtos períodos de uso (ZANIN e MORAES, 2014).

Outro fator que pode reduzir a estabilidade operacional da enzima imobilizada, é a deposição de impurezas sobre a superfície ou nos poros do suporte, dificultando o acesso do substrato à enzima e provocando uma perda de atividade. As principais impurezas normalmente são lipídeos, colóides, proteínas e partículas sólidas em suspensão. O grau de deposição no suporte é função da concentração, distribuição de tamanho, e natureza química e física do material suspenso. A obstrução também é acentuada quando se utilizam substratos concentrados ou viscosos (ZANIN e MORAES, 2014).

As preparações obtidas com o método de adsorção e ligação iônica geralmente conduzem a uma baixa estabilidade operacional. As preparações mais estáveis são obtidas com o método da ligação covalente, precedido da silanização do suporte (sílica porosa, vidro poroso e alumina). O revestimento do suporte com metais de transição seguido da ativação com glutaraldeído, que também favorece a ligação covalente da enzima, produz preparações com estabilidade comparável à do método de silanização. Acredita-se que a ligação covalente da enzima ao suporte pode estabilizar a estrutura terciária da enzima (CABRAL *et al.*, 2003).

2.10.6 Tipos de Reatores para Enzimas Imobilizadas

Dentre as várias aplicações para enzimas imobilizadas, a mais importante é sua aplicação industrial, por isso, o assunto é tão discutido. Em processos industriais, as enzimas imobilizadas são empregadas em reatores químicos, normalmente similares aos utilizados em catálise química (CHIBATA *et al.*, 1972; CAO, 2005; BULCHHOLZ *et al.*, 2005).

Uma característica geral de qualquer sistema com biocatalisadores imobilizados é que o transporte de substratos e produtos ocorre por mecanismos difusionais. Nos casos de biorreatores com enzimas imobilizadas, é comum observar um aumento de estabilidade e sua resistência à desnaturação quando se encontram imobilizadas (CASABLANCA e SANTÍN, 1998).

Os reatores enzimáticos são classificados em homogêneos e heterogêneos, dependendo do número de fases presentes no processo, sendo que no processo homogêneo ocorre apenas uma fase, enquanto no heterogêneo há duas ou mais fases. Um exemplo de reator heterogêneo é a solução de substrato sendo a fase líquida, e a enzima imobilizada a fase sólida. Outra classificação baseia-se na forma de operação, descontínuo (batelada) ou contínuo; ao grau de mistura, perfeita ou de escoamento tubular. O perfil de concentração dentro dos reatores pode variar apreciavelmente (CHIBATA *et al.*, 1972; CAO, 2005; BULCHHOLZ *et al.*, 2005; ZANIN e MORAES, 2014).

Enzimas imobilizadas possibilitam uma catálise heterogênea com ótimas vantagens: é possível utilizar um único grupo de enzimas repetidas vezes e interromper a reação apenas removendo fisicamente as enzimas imobilizadas da solução. Além disso, inclui a facilidade de determinação analítica de uma mistura complexa em um volume pequeno (ERGINER *et al.*, 2000).

2.10.6.1. Reator Batelada

O reator batelada pode ser utilizado em processos em que, terminada a reação, a enzima imobilizada pode ser separada da mistura final com relativa facilidade (filtração, decantação, por exemplo). Normalmente, a enzima é introduzida junto com o substrato no reator, sendo que o seu conteúdo é descarregado quando se alcança o grau de conversão desejado (ZANIN e MORAES, 2014). As principais desvantagens do reator descontínuo são:

- a) Mudanças das condições no decorrer da reação;
- b) Na ampliação de escala do reator, é difícil se manter um bom grau de mistura, devido à impossibilidade de se assegurar entrada proporcional de potência à medida que o reator aumenta de tamanho;
- c) Variação da qualidade do produtor de uma batelada para outra;
- d) Tempo morto entre as bateladas;
- e) Impossibilidade de se reutilizar a enzima quando não imobilizada, ou ainda, a tendência de se perder a enzima durante a recuperação entre as bateladas.

Estas desvantagens restringem o uso deste tipo de reator em larga escala (ZANIN e MORAES, 2014). A principal vantagem do reator tipo batelada é a eficiente transferência de calor e de massa devido à boa agitação do sistema.

2.10.6.2 Reator Contínuo (CSTR)

Os processos contínuos, quando comparados com os de batelada, apresentam-se superiores, principalmente por facilitarem o controle automático, por serem mais fáceis de operar e favorecerem o controle de qualidade do produto obtido (PRËNOSIL *et al.*, 1987). Os reatores contínuos podem ser divididos em dois tipos básicos: reatores contínuos tipo tanque agitado (CSTR) e reatores tubulares (leito fixo e leito fluidizado).

No CSTR ideal, as concentrações de substrato e produto no seu interior variam continuamente, da entrada à saída. No reator contínuo de tanque agitado, há entrada e saída contínua de fluido em um reator com agitação. Eventualmente, uma certa quantidade de enzima pode ser arrastada no efluente, devendo-se por isso, acoplar na saída um

sistema que permita recuperá-la. Neste tipo de reator não existem gradientes de temperatura ou de concentração, devido à eficiente agitação que promove um contato íntimo entre a enzima e o meio de reação. O reator CSTR possui alguns tipos de configurações diferenciadas e especiais. Numa delas, na sua forma mais simples, o substrato é adicionado ao tanque contendo a enzima imobilizada, que fica em suspensão na mistura de reação. O produto e o substrato remanescente são retirados continuamente do tanque. Um filtro colocado na saída impede que a enzima seja retirada do sistema. Uma outra forma alternativa consiste em reter a enzima imobilizada nas pás do eixo de agitação ou nas chicanas, com o intuito de minimizar a resistência à transferência de massa entre a fase líquida e o biocatalisador e, principalmente, reduzir a quebra e o desgaste das partículas por atrito (FOGLER, 2002).

2.10.6.3 Reator batelada alimentada

A utilização do processo batelada alimentada, também conhecido como “Melle-Boinot” no Brasil, se generalizou no final da década de 1960 e na década de 1970. Quando houve a criação do programa Nacional do Alcool, em 1976, todas as destilarias foram equipadas com este processo. Basicamente, o processo descontínuo alimentado é definido como uma técnica em processos microbianos, na qual um ou mais nutrientes são adicionados ao fermentador durante o cultivo e os produtos gerados permanecem até o final da fermentação. A vazão de alimentação pode ser constante ou variar com o tempo, e a adição de mosto pode ser de forma contínua ou intermitente (CARVALHO e SATO, 2001).

O principal objetivo da operação em modo batelada alimentada é controlar a concentração do substrato (SILVA *et al.*, 2003). Este processo é usado quando se procura diminuir o efeito inibitório causado pelo excesso de substrato. Yamane e Shimizu (1984) definiram o processo como sendo um cultivo onde existe adição de um ou mais nutrientes. A forma de adição pode ser com vazão constante ou variável, contínua ou intermitente (KELLER e DUNN, 1978). Essa forma de operação é típica da área de Engenharia Bioquímica, e foi praticamente desenvolvida para os processos fermentativos, sendo muito pouco frequente para reatores químicos não biológicos.

2.11 Imobilização de β -galactosidase e Produção de Galacto-oligossacarídeos

A enzima β -galactosidase tem sido imobilizada por diversas técnicas, incluindo adsorção física, encapsulamento em gel e ligações covalentes (DI SERIO *et al.*, 2003; EMBREGUL *et al.*, 2006). A escolha do suporte é determinada pelas condições em que a

enzima será usada e pelo método de ligação envolvido. Um grande número de suportes tem sido usado e novos suportes continuam a surgir, provavelmente devido ao fato de nenhum deles ser ideal para a prática.

Prenosil *et al.*, (1987) observaram uma diminuição na produção de GOS de lactose (15 % m/v) como resultado da imobilização de β -galactosidase de *Aspergillus niger* em Duolite s-76. Eles sugeriram que a presença de restrições internas na transferência de massa pode ser responsável pelos menores rendimentos obtidos. No entanto, na maioria dos casos, as limitações de transferência de massa são insignificantes, devido à alta concentrações de substrato (40 % m/v) empregadas no síntese (HUERTA *et al.*, 2011).

Zhong-Chen-Hu *et al.*, (1993) estudaram a β -galactosidase de *Aspergillus oryzae*, imobilizada em espuma de poliuretano em reator de leito dinâmico, em pH 7,3 e temperatura de 37 °C. A enzima β -galactosidase ficou estável nas condições operacionais aproximadamente por 15 horas.

Sheldon *et al.*, (1998) imobilizaram β -galactosidase comercial de *Aspergillus oryzae* e *Kluyveromyces fragilis* por adsorção em resina fenol-formaldeído denominada Duolite. Ates e Mehmetoglu (1997) desenvolveram um novo método de imobilização por entrelaçamento da enzima em alginato de cobalto

Sheu *et al.*, (1998) estudaram a formação de galacto-oligossacarídeos (GOS) em um reator tubular, com β -galactosidase de *Aspergillus oryzae*, imobilizada tratada com glutaraldeído em esferas de quitosana. Os máximos rendimentos alcançados foram 18, 21 e 26 % com concentrações de lactose de 100, 200 e 300 g L⁻¹ respectivamente. Obtiveram menores rendimentos de GOS no sistema imobilizado do que no sistema da enzima solúvel. No sistema contínuo de reação, não observaram perda significativa de atividade depois de 30 dias de operação.

Obón *et al.*, (2000) estudaram a imobilização da β -galactosidase derivada de *Kluyveromyces lactis* em AMBERLITE IRC-50 para hidrólise da lactose do leite. Tanniseven e Dogan (2002) utilizaram β -galactosidase derivada de *Aspergillus oryzae* para imobilização em alginato de sódio com gelatina endurecidas com glutaraldeído. A imobilização resultou num rendimento de 56 % e a atividade relativa retida por 35 dias sem decréscimo.

Brena *et al.*, (2001) estudaram o processo de imobilização de β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* e *Escherichia coli*, por ligação agarose-glutaraldeído de grupos amino e agarose-tiosulfonato, pelos grupos tiol. Em geral, grupos TSI-agarose exibiram rendimentos maiores (60 a 85 %) do que o outro grupo (36 a 40 %). Mammarella e Rubiolo (2003) estudaram a eficiência de β -galactosidase de *Kluyveromyces fragilis* encapsulada em gel de alginato de cálcio e K-carragena e sua estabilidade operacional nas matrizes formadas, determinando a atividade do biocatalisador. A desativação térmica e as perdas

de proteínas devido ao aumento de tamanho da partícula do gel foram avaliadas e levadas em consideração na equação da taxa de reação. Os resultados mostraram que, a quantidade de enzima encapsulada no gel foi reduzida, devido à perda de proteína, causada pelo aumento de tamanho da partícula do gel.

Di Serio *et al.*, (2003) utilizaram β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* para estudar os efeitos cinéticos e da influência de três tipos de suportes na imobilização. Neste estudo foi analisado o comportamento cinético da enzima β -galactosidase imobilizada em diferentes suportes óxidos, tais como alumina, sílica e silicato de alumina. Observaram uma forte dependência entre a atividade da enzima imobilizada com a natureza química e a estrutura física do suporte, em especial o tamanho da partícula. O suporte sílica apresentou uma melhor performance do que a alumina para estruturas porosas similares. Já o silicato de alumina apresentou resultados comparativos com os obtidos em sílica, confirmando a importância da natureza química do suporte. A atividade enzimática decresceu com o aumento do tamanho da partícula. Um estudo cinético de pellets esféricos de sílica (0,25 - 0,50 mm) em um reator de leito fixo foi realizado. O modelo cinético que mais se ajustou foi de Michaelis-Menten, com inibição pelos produtos.

Maugard *et al.*, (2003) estudaram a síntese de galacto-oligossacarídeos a partir de β -galactosidase de *Kluyveromyces fragilis* solúvel e imobilizada, utilizando irradiação de micro-ondas ou aquecimento convencional. O suporte utilizado para a imobilização foi a resina Duolite A-568, que aumentou a síntese dos galacto-oligossacarídeos (GOS). Foi examinado a vantagem de irradiação por micro-ondas na formação dos GOS, que se obteve como resultado um aumento na síntese dos mesmos.

Spletchna *et al.*, (2007) relataram a síntese de GOS em CSTR com um fluxo externo cruzado em membrana de ultrafiltração usando β -galactosidase de *Lactobacillus reuteri* e comparou com a síntese com a convencional, mas o foco estava nas diferenças de composição de GOS e não em parâmetros operacionais.

Ebrahimi *et al.*, (2010) também relataram a síntese de GOS em um CSTR equipado com uma membrana de cerâmica e destacaram a conveniência de tal sistema, embora reconhecendo que os parâmetros de operação ainda precisariam ser otimizados. Mais recentemente,

Valiseva *et al.*, (2012) desenvolveram uma membrana funcionalizada para imobilizar a β -galactosidase isolada de *Escherichia coli*, via ligação cruzada e ligação química covalente. A membrana utilizada foi uma membrana de polipropileno funcionalizada (espessura 150 μm , porosidade efetiva de 90 % e tamanho médio de poro de 0,2 μm). A imobilização conferiu aumento na atividade. A 50 °C, a atividade para a imobilizada foi 60 % e para a enzima solúvel 10,7 %. Também foi obtida maior atividade relativa (92,77 %) com membrana modificada por hexametilenodiamina. A capacidade de

armazenamento aumentou com a imobilização. Após 300 dias, a atividade relativa se manteve em 90 % da capacidade inicial, frente a 45 % para a enzima solúvel.

Bernal *et al.*, (2014) realizaram estudo comparando a imobilização via ligação covalente em sílica, ativada por grupos glioxil, com o método de adsorção, utilizando a enzima β -galactosidase. Na imobilização por adsorção, o catalisador obtido apresentou rendimento de imobilização e atividade específica inferior. Mas, a imobilização covalente em sílica ativada conferiu maior estabilidade térmica a 55 °C, pelo menos para β -galactosidase de *B. circulans* e *Kluyveromyces lactis*. A estabilidade aumentou em 120 vezes e o rendimento de imobilização foi de 60 % para a imobilização na presença de glicerina, o que suprime completamente a lixiviação, como é esperado, em comparação com a adsorção sobre a sílica sem tratamento.

Palai *et al.*, (2014) investigaram e avaliaram a cinética de formação de galactooligosacarídeos (GOS), com alimentação e recirculação parcial a partir de uma solução de lactose, utilizando β -galactosidase de *Bacillus circulans* grau comercial, imobilizada via ligação cruzada em membrana de PVDF microporosa hidrofóbica (tamanho de poro 0,22 μm , diâmetro 0,047 m, espessura 125 μm , porosidade de 75 % e permeabilidade de água 9000 L h⁻¹ m⁻²). Estudos foram realizados para observar o efeito da concentração de lactose e da taxa de alimentação na formação de GOS. A máxima formação de GOS obtida foi de 30 % após 60 h, concentração de lactose inicial 50 g L⁻¹; 0,5 mL min⁻¹ de taxa de alimentação e 1,5 mL min⁻¹ de taxa de recirculação a 40 °C. Foi observado que a seletividade para GOS aumentou e que houve uma leve redução na produção de GOS com o aumento da concentração inicial de lactose. Após 30 dias, a atividade enzimática relativa foi de 50 % da inicial para a enzima imobilizada, frente a 100 % de perda para a enzima solúvel após 21 dias. O modelo cinético desenvolvido mostrou muito boa concordância com os resultados simulados mesmo a baixas concentrações de lactose.

Vera *et al.* (2014) realizaram estudo comparando a produção de GOS por *Aspergillus oryzae* em reator batelada e batelada alimentada. A síntese em batelada alimentada permitiu um aumento na concentração máxima total de GOS de 115 (batelada) para 218 g, como consequência do aumento da concentração de açúcares totais 40 - 58 % m / m. Essa alta concentração de açúcares totais não era atingida no processo em batelada, devido à baixa solubilidade da lactose na temperatura reacional (40 °C).

Ansari *et al.*, (2015) sintetizaram e modificaram a superfície de nanodiamantes (nanopartículas de carbono com arquitetura octaédrica; 20 nm), com glutaraldeído para imobilização da β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* e compararam a estabilidade e a atividade com a enzima solúvel. A imobilização conferiu maior retenção de atividade (87 % atividade inicial após 5 usos); aumento gradual e constante da hidrólise da lactose para imobilizadas com o tempo e diminuição rápida para a enzima solúvel.

Valiseva *et al.*, (2016) realizaram um estudo de otimização das condições de hidrólise da lactose por β -galactosidase solúvel e imobilizada em um processo batelada. Estudaram a estabilidade da enzima e encontraram as condições ótimas de hidrólise de soro de leite para um reator contínuo de membrana de fibra oca. Avaliaram o reuso da enzima imobilizada em um módulo de membrana contínuo. A enzima utilizada foi a β -galactosidase isolada de *Escherichia coli*. A enzima foi imobilizada por ligação cruzada via glutaraldeído em uma membrana de polipropileno (espessura 150 μm , porosidade efetiva de 90 % e tamanho médio de poro de 0,2 μm). A hidrólise da lactose com a enzima imobilizada foi 60 % mais eficaz do que com a enzima solúvel e a estabilidade foi 2 vezes maior. Parâmetros ótimos da membrana para processo contínuo: 100 cm^2 e 1,0 mL min^{-1} . Após 10 h a hidrólise foi de 91 %. A retenção da atividade enzimática após 20 ciclos foi de 70 %.

Córdova *et al.*, (2016) projetaram e otimizaram um biorreator de membrana de ultrafiltração, utilizando altas concentrações de lactose. O sistema permitiu um significativo aumento na quantidade de substrato processado, e um aumento de 2,44 vezes na quantidade de GOS produzido por unidade de massa de catalisador. Isto foi obtido em relação a um sistema batelada, concluindo que os resultados podem ser melhorados além disso, otimizando a relação área da membrana/volume de reação.

Khan *et al.*, (2017) desenvolveram um método efetivo de imobilização da β -galactosidase de *Aspergillus oryzae*, via ligação química covalente e ligação cruzada. Foi utilizado como suporte nanocompósito de nanotubos de carbono de paredes múltiplas com polianilina cobalto (tamanho de partícula 18 a 23 nm). A imobilização conferiu maior resistência à desnaturação por temperatura para enzimas imobilizadas por ligação covalente e por ligação cruzada (46 e 78 % da atividade inicial), frente à solúvel (5 %). Maior retenção da atividade após 10 usos para as imobilizadas por ligação cruzada (92 % da atividade inicial), que para as por ligação química covalente (74 %).

Guerrero *et al.*, (2018) avaliaram o efeito do tipo de imobilização no rendimento e seletividade para a síntese de oligossacarídeos. A enzima β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* foi imobilizada por reticulação e agregação (CLA) e por ligação covalente à glicosil agarose monofuncional (GA), e aos suportes heterofuncionais – agarose amino-glioxil (Am-GA), carboxi-glioxil-agarose (Cx-GA) e quelato-glioxil-agarose (Che-GA), com o objetivo de determinar o efeito da imobilização no desempenho dos biocatalisadores em termos de produtividade, parâmetros cinéticos e distribuição dos produtos na síntese de oligossacarídeos transgalactosilados (lactulose, galacto-oligossacarídeos e frutossil-galacto-oligossacarídeos). Em todas as reações de transgalactosilação, o rendimento foi pouco afetado pelo tipo de imobilização; entretanto, um forte efeito sobre a produtividade foi observado, sendo maior com a enzima imobilizada em CLA- β G e Am-GA, e a menor

com a enzima imobilizada como Cx- GA e Che-GA. O tipo de imobilização teve forte influência nos parâmetros cinéticos aparentes dos biocatalizadores, afetando a composição do produto durante a síntese de oligossacarídeos transgalactosilados. Restrições difusionais dos biocatalizadores aumentaram com o grau de reticulação, tamanho de partícula e carregamento de enzima; no entanto, seu efeito sobre a síntese dos produtos transgalactosilados foi baixo, uma vez que as reações foram conduzidas em concentrações muito elevadas de substrato. Os resultados sugerem que, devido às condições de operação, a imobilização tem um impacto mais crítico na hidrólise da lactose do que na sua transgalactosilação, na qual o uso de concentrações muito altas de substrato é obrigatório.

Guerrero *et al.*, (2019) estudaram a síntese de lactulose a partir de frutose e lactose em operação contínua em reator de leito empacotado com glioxil-agarose e β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* imobilizada. O efeito do fluxo, proporção de substrato, e a relação de massa de empacotamento de material inerte ao biocatalisador (MB/MIM) foram estudadas no desempenho do reator. Um aumento em qualquer uma dessas variáveis produziu um aumento no rendimento de lactulose (YLu), sendo maior do que o obtido na síntese em batelada em condições comparáveis.

2.12 Considerações Finais

De acordo com o encontrado na literatura, neste trabalho, realizou-se a produção de galacto-oligossacarídeos, primeiramente em reator batelada, utilizando a enzima β -galactosidase, proveniente de *Kluyveromyces lactis*. A enzima foi imobilizada em sílica ativada com glioxil e posterior reticulação com glutaraldeído, visando maior estabilidade térmica. Para este sistema foram otimizadas as melhores condições de: tampão do substrato, concentração de lactose no substrato, quantidade de biocatalisador utilizado na reação e temperatura da reação. Com as melhores condições de síntese obtidas nesse sistema, a título de comparação, foram realizadas sínteses em reator batelada alimentada e reator contínuo (CSTR). Estas configurações de reatores são pouco usadas na literatura para a produção de galacto-oligossacarídeos e foram utilizadas a fim de manter a concentração de lactose sempre alta.

3. CAPÍTULO III - MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo está descrita toda a metodologia experimental, bem como os equipamentos utilizados na realização do trabalho. Na Figura 3.1, apresenta-se um diagrama resumido da sequência em que foi feito o trabalho:

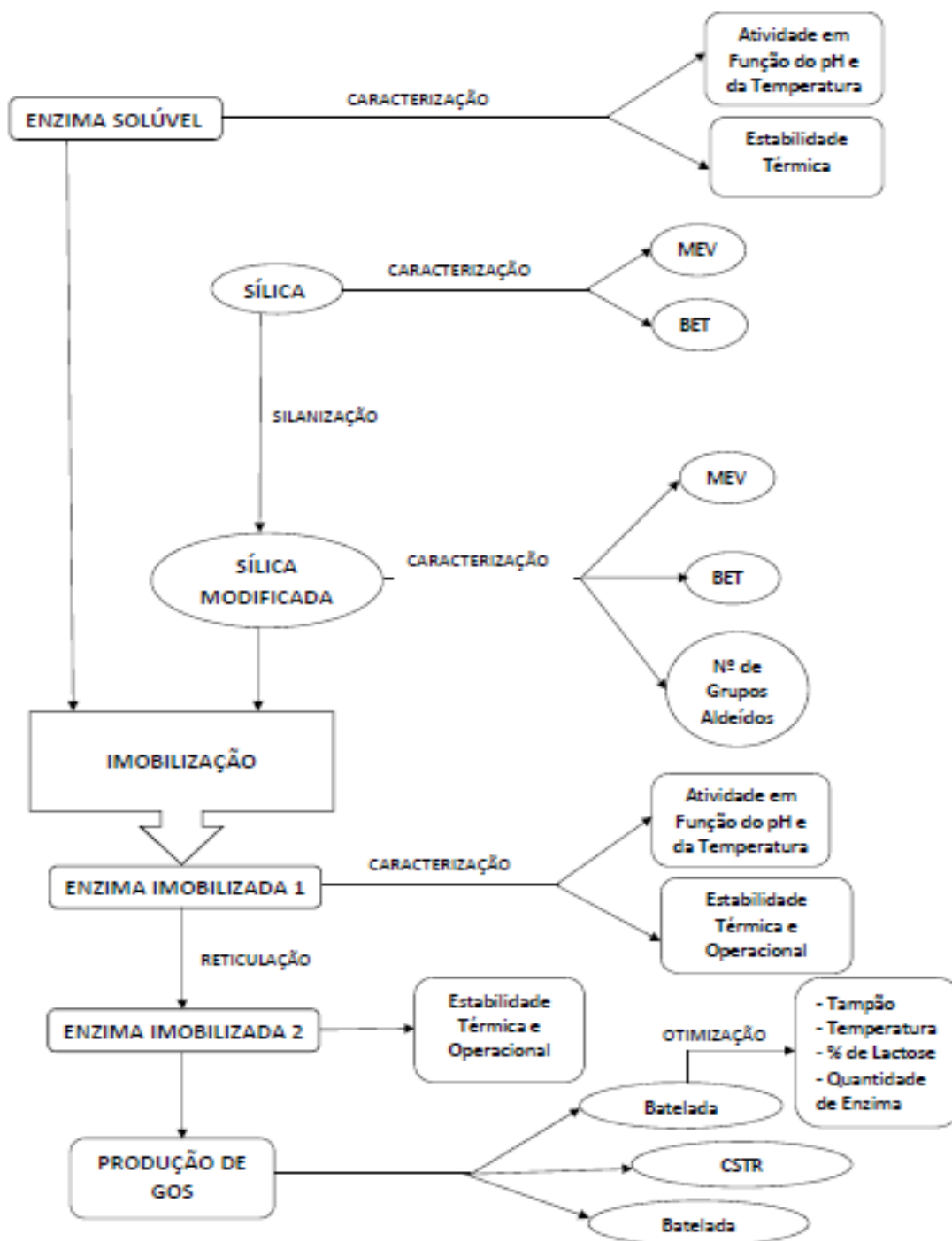


Figura 3.1 - Diagrama da sequência de procedimentos realizados neste trabalho.

Fonte: A autora.

3.1 3.1 Materiais

3.1.1 Substrato

O substrato utilizado foi o soro de leite em pó, adquirido da indústria CATIVA (Cooperativa Agro, Londrina-PR). A constituição média deste material mostrada na Tabela 3.1, foi analisada no DQI – UEM.

Tabela 3.1 - Caracterização química do soro de leite em pó

Análises	Valores (%)
Umidade	0,54 %
Cinzas	5,07 %
Proteína	13,12 %
Gordura	1,12 %
Lactose	75,00 %

3.1.2 Solução Tampão de Formulação Especial

O tampão de formulação especial contém a mesma concentração dos principais minerais encontrados naturalmente no leite de vaca e tem a composição mostrada na Tabela 3.2.

O pH do tampão foi ajustado com HCl 1N e NaOH 4N. Foi adicionado 0,01 % de NaN₃ como conservante. O tampão foi preparado com água destilada.

Tabela 3.2 - Composição da solução tampão de formulação especial.

Reagentes	Mmol L ⁻¹
Citrato de Na ₃ H ₂ O	2,70
Ácido Cítrico. H ₂ O	7,91
K ₂ SO ₄	1,03
K ₂ HPO ₄	2,99
KH ₂ PO ₄	10,80
KOH	19,43
MgCl ₂ .6H ₂ O	4,08
CaCl ₂ 2H ₂ O	5,10
NaOH 4 eq/L	10,00
NaHCO ₃	3,33

Fonte: Adaptado de Novo (1979) e Matioli *et al.*, (2001).

3.1.3 Enzima

Beta-galactosidade (E.C. 3.2.1.23), obtida a partir da fermentação de cepas selecionadas da levedura *Kluyveromyces lactis*. A preparação comercial utilizada foi a Lactozym 2600 L (LAU mL⁻¹) Novozymes, adquirida da Sigma-Aldrich, onde, um LAU corresponde à quantidade de enzima que libera 1,0 micromol de glicose por minuto, sob condições de reação padronizada.

3.1.4 Suporte

A sílica de porosidade controlada foi fornecida pela Corning Glass Works (Corning, NY). Foram realizadas análises de BET e MEV na sílica antes e após o tratamento químico.

3.1.5 Reagentes Analíticos

O reagente GOD-PAD utilizado na determinação enzimática da glicose das amostras, foi o kit da Bioliquid.

Na determinação do teor de proteína da enzima β -galactosidase, empregou-se como padrão a albumina bovina, contendo 4 g de proteína total / 100mL da Merck. O reagente azul de Comassie utilizado foi adquirido da Synth.

Para silanização do suporte, foi utilizado GPTMS (3-glicidoxipropiltri-metoxisilano) adquirido da Sigma-Aldrich.

Na reação pós-imobilização, foi utilizado Glutaraldeído 25 %, Riedel-de Haën, Qumibrás Ind. Química.

Na realização das curvas padrão para a cromatografia líquida (CLAE) foram utilizados os seguintes reagentes:

- a) Padrão CLAE Supelco ALFA-LACTOSE MONOHIDRATA;
- b) Padrão CLAE Supelco D-(+) GLICOSE;
- c) Padrão CLAE Fluka GALACTOSE.

Os demais reagentes foram de grau analítico P.A.

3.1.6 Equipamentos

Para os ensaios de determinação da atividade da enzima beta-galactosidase, reações de hidrólise e reações de produção de galacto-oligossacarídeos; utilizou-se um reator de vidro com camisa, por onde circulava água aquecida na temperatura do ensaio.

A agitação da solução dentro do reator foi promovida por meio de agitador magnético, como pode ser observado na Figura 3.2.

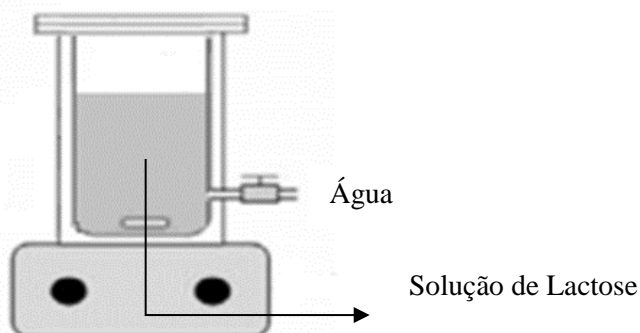


Figura 3.2 - Esquema de um reator batelada

Fonte: Adaptado de Rossetto, (2013).

Outros equipamentos e materiais consumíveis utilizados no desenvolvimento deste trabalho foram:

- a) Espectrofotômetro UV-VIS, marca SHIMADZU, modelo UV-1601PC;
- b) pHmetro TECNAL, modelo TEC-2;
- c) Agitador de tubos PHOENIX AT 56;
- d) Banho termostático Dubnoff Tecnal TE-053;
- e) Bomba Tecnal TE-0198;
- f) Bomba MasterFlex Modelo 75563-70 (6-600 rpm);
- g) Balança semi-analítica METTLER PM400;
- h) ASAP 2020 Micromeritics;
- i) Cromatógrafo líquido de alta performance (CLAE), marca GILSON, equipado com detector UV/VIS-152;
- j) Coluna para CLAE SUPELCOGEL CA (9 μ m, 30 cm X 7,8 mm);
- k) Pré-coluna SUPELCOGEL CA (9 μ m, 5 cm X 4,6 mm).

3.2 Métodos

3.2.1. Determinação da Concentração de Glicose

A concentração de glicose medida durante a reação da hidrólise da lactose foi realizada pelo método de GOD-PAD, utilizando o kit enzimático colorimétrico da Bioliquid (TRINDER, 1969).

3.2.2. Teor de Proteína da Enzima

O teor de proteína da enzima β -galactosidase (LACTOZYM 2600L ($U\ mL^{-1}$) foi determinado pelo método colorimétrico do azul de Comassie (BRADFORD, 1976). O teor de proteína medido foi igual a $10,19\ mg\ mL^{-1}$ de solução de enzima comercial.

3.2.3 Determinação da Atividade da Enzima

A atividade da enzima beta-galactosidase foi determinada pelo método das velocidades iniciais. A solução tampão utilizada foi a apresentada no item 3.1.2, Tabela 3.2.

3.2.3.1 Método das Velocidades Iniciais

A atividade enzimática foi determinada pelo método das velocidades iniciais em reator batelada com agitação magnética (Figura 3.2) (MATIOLI *et al.*, 2001). As amostras eram retiradas do reator em intervalos de tempo pré-determinados, acompanhando a conversão de lactose em glicose e galactose.

A velocidade inicial da reação foi determinada fazendo-se a regressão linear entre a glicose produzida na reação (μ moles) e o tempo de reação (minutos), utilizando-se o método dos mínimos quadrados. A glicose produzida foi calculada pela equação (3.1):

$$GP = ([C_G] - [C_{G1}]) * \frac{V_r}{M_g} \quad (3.1)$$

Em que: GP = concentração de glicose produzida (μ mol); $[C_G]$ = concentração de glicose na amostra no tempo 't' ($mg\ mL^{-1}$); $[C_{G1}]$ = concentração inicial de glicose ($mg\ mL^{-1}$); V_r = volume da reação no tempo 't' (mL); M_g = massa molar da glicose ($0,18\ mg$ de glicose / μ mol).

A atividade enzimática foi calculada a partir da equação 3.2:

$$ATIVIDADE\ (U.\ mL^{-1}) = \frac{\mu_{mol\ de\ glicose}}{tempo * V_{enzima}} \quad (3.2)$$

Em que: V_{enzima} = volume da enzima empregado no ensaio.

A atividade específica da enzima foi calculada pelo coeficiente angular da curva de glicose em função do tempo:

$$A_e = \frac{b_1}{P} \quad (3.3)$$

Em que: A_e = atividade específica (U mg⁻¹); b_1 = coeficiente angular da curva de glicose em função do tempo de reação; P = massa de proteína utilizada no ensaio (mg).

A determinação da atividade enzimática foi baseada na metodologia proposta por Matioli *et al.*, (2001), conforme descrito a seguir:

- a) Preparou-se uma solução 5 % (m/v) de lactose em tampão de formulação especial (Tabela 3.2) e ajustou-se o pH com HCL 1N e NaOH 4N.
- b) No reator batelada foram adicionados 50 mL da solução de lactose 5 % (m/v) em soro de leite e ajustado a temperatura.
- c) Após a temperatura estabilizada, foi adicionado 1,0 mL da solução da enzima na concentração desejada (1 : 50) para a enzima solúvel. Após 15 segundos foi retirada uma amostra de 0,5 mL e adicionada em um tubo de ensaio contendo 1,0 mL de água destilada. O tubo foi tampado e imerso em banho com água fervente, por 10 minutos, para inativação da enzima. Em seguida, foi resfriado em banho-maria com água a temperatura ambiente. Os tubos foram mantidos a 4 °C até a dosagem de glicose pelo método GOD-PAD.
- d) Novas amostras foram retiradas de 5 em 5 minutos até completar 30 minutos de reação.
- e) A atividade enzimática foi calculada pelas equações 3.2 e 3.3.

3.2.4. Propriedades Catalíticas da Enzima β -Galactosidase Solúvel

3.2.4.1. Atividade Específica em Função do pH e da Temperatura

A atividade específica da enzima solúvel foi determinada em reator batelada como descrito no item 3.2.3. O substrato foi preparado com uma solução de soro de leite em pó com 5 % (m/v) de lactose em 10 % de tampão de formulação especial. O teor de proteína da enzima foi de 10,19 mg mL⁻¹ de solução, utilizando uma diluição da enzima de 1:50.

A faixa de pH testada foi de 6,0; 6,5; 7,0 e 7,5 e a temperatura de 30, 35, 40, 45 e 50 °C. Foi utilizada a solução tampão recomendada pela NOVO INDUSTRI S/A (NOVO, 1979 e MATIOLI *et al.*, 2001) descrita no item 3.1.2.

O tempo de incubação da enzima foi de 30 minutos para cada temperatura, retirando amostra de 5 em 5 minutos.

O ensaio foi realizado conforme descrito a seguir (MATIOLI *et al.*, 2001):

- a) Preparava-se 50 mL de cada solução tampão em todos os pH (6,0; 6,5; 7,0 e 7,5);
- b) Preparava-se 100 mL de solução de soro de leite em pó com 5 % (m/v) de lactose em cada pH;
- c) Preparava-se uma solução enzimática diluída 1 : 50;
- d) Aquecia-se o banho na temperatura desejada;
- e) No reator batelada eram adicionados 50 mL da solução de lactose 5 %, e esperava-se a temperatura estabilizar;
- f) Adicionava-se 1,0 mL da solução da enzima, e após 15 segundos retirava-se 0,5 mL da amostra, que era colocada em tubo contendo 1 mL de água. O tubo tampado era imerso num banho de água fervente durante 10 minutos, com o objetivo de inativar a enzima, e resfriado à temperatura ambiente. Este era o branco, ou seja, o ponto correspondente ao tempo zero;
- g) Em seguida, retirava-se amostras de 0,5 mL de 5 em 5 minutos até completar o tempo de 30 minutos. Estas amostras eram submetidas ao mesmo tratamento feito ao branco (etapa f).
- h) Posteriormente, os tubos eram mantidos a 4 °C até dosagem de glicose pelo método GOD-PAD, descrito no item 3.2.1;
- i) A atividade específica foi calculada pela equação 3.3.

3.2.4.2 Estabilidade Térmica da Enzima

A estabilidade térmica da enzima β -galactosidase, em presença de substrato (solução de soro de leite em pó com 5 % (m/v) de lactose em 10 % (v/v) de tampão de formulação especial, pH 6,5), foi determinada nas temperaturas de 30, 35, 40, 45 e 50 °C.

O experimento seguiu as seguintes etapas (MATIOLI *et al.*, 2001):

- a) Aqueceu-se o banho para a temperatura desejada;
- b) Colocava-se em um balão, 100 mL de substrato. Este era tampado e imerso no banho, onde permanecia 10 minutos a fim de atingir o equilíbrio térmico;
- c) No reator batelada (item 3.1.6), colocava-se 50 mL da solução de substrato e aguardava-se cerca de 5 minutos para a estabilização da temperatura;
- d) Adicionava-se ao balão (etapa b), 1 mL da enzima β -galactosidase. Homogeneizava-se e acionava-se o cronômetro. Esta solução estoque de enzima permanecia incubada na temperatura desejada, sendo que a intervalos de 40 minutos uma alíquota de 1 mL era retirada para a determinação da atividade residual a 45 °C, procedendo-se como indicado nas etapas f a g subsequentes;
- e) Adicionava-se ao reator batelada (etapa c), 1 mL da solução estoque de enzima (etapa d), acionava-se o cronômetro, aguardava-se 10 segundos e retirava-se uma

- amostra de 0,5 mL, que era adicionada em tubos contendo água destilada. A inativação da enzima era realizada como no item 3.2.3;
- f) Este era o branco e correspondia ao tempo zero da reação;
 - g) Prosseguia-se retirando-se amostras de 0,5 mL a cada 5 minutos até integralizar 30 minutos de reação. Todas as amostras eram tratadas como no item 3.2.3;
 - h) Após 30 minutos de reação, lavava-se o reator com água, secava-se com papel absorvente, adicionava-se novos 50 mL de solução de lactose 5 %, pH 6,5 e aguardava-se 5 minutos para atingir o equilíbrio térmico (45 °C);
 - i) As etapas f a g eram repetidas até se integralizar 240 minutos de incubação da solução de enzima (etapa d);
 - j) A atividade específica da enzima foi calculada pela equação 3.3.

3.2.5 Imobilização da Enzima β -Galactosidase

A imobilização da enzima β -galactosidase, em sílica porosa, foi feita pelo método de ligação covalente, que compreendia as seguintes etapas: (a) modificação química da sílica; (b) imobilização da enzima; (c) reticulação com glutaraldeído após a imobilização.

Este método, cujas etapas estão descritas a seguir, é uma adaptação do método original de Bernal *et al.*, (2014). Foram alterados os seguintes parâmetros: temperatura e concentração de GPTMS na etapa de silanização da sílica, quantidade de NaIO_4 na etapa de oxidação da sílica, temperatura, quantidade de enzima, pH e tempo na etapa de imobilização.

3.2.5.1 Modificação Química da Sílica

Este procedimento foi aplicado para 1 g de suporte.

A sílica de porosidade controlada foi silanizada com 30 mL de solução aquosa de GPTMS ((3-Glycidoxipropil)metildietoxisilano), de diferentes concentrações (0,1; 0,5; 1,0; 1,5 e 10,0 %), a 60 °C, durante 6 h, sob agitação suave. A hidrólise dos grupos epóxi foi realizada com H_2SO_4 0,1 M durante 2 h a 60 °C. Após isto, o material foi filtrado e lavado com mistura de acetona-água (50 %) e seco a 45 °C por 12 horas. A oxidação foi processada com solução de NaIO_4 0,016 M, durante 2 h a 20 °C. Ao final da modificação química o material foi seco a 45 °C por 24 horas. Durante a etapa de modificação, foi formado um intermediário reativo que continha um grupamento aldeído conforme a Figura 3.3. Na etapa de imobilização, foram formadas bases de Schiff entre o grupamento aldeído do suporte e o grupamento amina da enzima Bernal *et al.*, (2014).

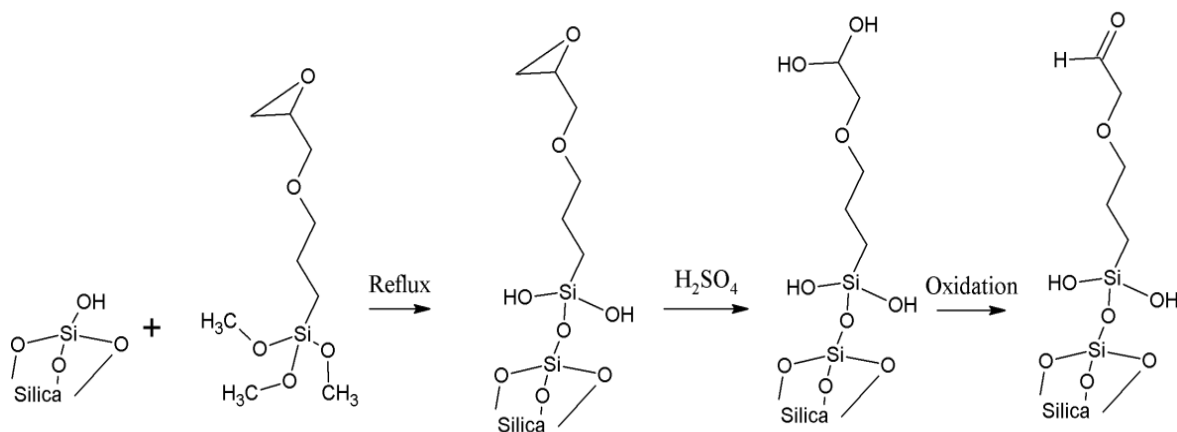


Figura 3.3 - Esquema da reação que ocorre durante a modificação química da sílica (

Fonte: Adaptado Bernal *et al.*, (2014)

3.2.5.2 Reação de Imobilização da enzima

Misturou-se o suporte com 5mL de solução enzimática tamponada (250 U de β -galactosidase por mL de solução, pH 6,5, 100 mM tampão de formulação especial (Tabela 3.2)), e a suspensão foi incubada a 20 °C durante 48 h, sob agitação. Em seguida, o derivado foi reduzido com uma solução de NaBH₄ (4 mg por mL de solução), durante 30 min a 20 °C. A recuperação da proteína na enzima imobilizada foi determinada como a diferença das medidas de concentração de proteína nas soluções da enzima solúvel e a do final da imobilização.

3.2.5.3 Reticulação com Glutaraldeído após a Imobilização

Visando aumentar a estabilidade térmica da enzima, foram testadas diferentes concentrações de glutaraldeído (0,1; 0,5; 1,0 e 2,0%) na reação pós-imobilização via ligação cruzada. O reagente foi adicionado puro, junto com toda a solução de imobilização, antes de adicionar o NaBH₄. Deixou-se reagir por 30 min e em seguida adicionou-se o NaBH₄ (200 mg), deixando reagir por mais 30 min, sob agitação constante. Finalmente, o biocatalisador foi filtrado, lavado e armazenado em solução tampão em ambiente refrigerado.

3.1.6 Caracterização da Enzima β -Galactosidase Imobilizada

3.2.6.1 Determinação da Quantidade de Enzima Fixada

A quantidade de enzima fixada no suporte era determinada como indicado a seguir (ZANIN, 1989):

- a) Dosava-se o teor de proteína da solução diluída de enzima antes da imobilização;
- b) Dosava-se o teor de proteína da solução de enzima após o processo de imobilização;
- c) Dosava-se o teor de proteína nas diferentes frações de água de lavagem;
- d) A quantidade de enzima fixada era (proteína determinada na etapa a) – (proteína determinada na etapa b + proteína determinada na etapa c);
- e) A quantidade de enzima fixada por grama de suporte era obtida dividindo-se a proteína fixada (etapa d) pela massa de sólido seco utilizada (mg proteína / g suporte).

3.2.6.2 Determinação da Atividade da Enzima Imobilizada

A atividade da enzima β -galactosidase foi determinada pelo método das velocidades iniciais (item 3.2.3), utilizando-se como substrato 50 mL solução de soro de leite em pó com 5 % (m/v) de lactose em 10 % de tampão de formulação especial, pH 6,5. O ensaio foi conduzido como descrito a seguir (ZANIN e MORAES, 1998):

- a) Pegava-se uma certa quantidade de enzima (aproximadamente 5 g), lavava-se com água destilada no funil de Büchner, e em seguida deixava-se secar, com o vácuo ligado, durante 20 minutos, aproximadamente;
- b) Pesava-se em uma cesta, 1 g de enzima imobilizada (massa úmida), e 1 g de enzima imobilizada em um cadinho de porcelana para determinação da umidade a 105 °C;
- c) Colocava-se a cesta no reator batelada, que já continha 50 mL de solução de lactose na temperatura equilibrada desejada, e acionava-se o cronômetro;
- d) Retirava-se amostras de 0,5 mL a cada 5 minutos até completar 30 minutos de reação. Após esse período, a cesta era removida e continuava-se a reação por mais 10 minutos quando se retirava uma nova amostra;
- e) As amostras eram submetidas ao tratamento indicado no item 3.2.3.

A atividade (A_i) da enzima imobilizada, obtida a partir do coeficiente angular (b_1) da reta ajustada aos dados da glicose produzida (micromoles) em função do tempo (minutos), representa o número de unidades (U) por grama de suporte (massa seca).

$$A_i = \frac{b_1}{M_s} \quad (3.4)$$

Em que: A_i = atividade da enzima imobilizada (U g^{-1}); M_s = massa de suporte, massa seca (g).

A atividade específica (A_{ie}) da enzima imobilizada é definida como sendo a atividade por mg de proteína fixada, obtida pela equação 3.5:

$$A_{ie} = \frac{A_i}{\text{mgproteína/gsuporte}} \quad (3.5)$$

Em que: A_{ie} = atividade específica da enzima imobilizada (U mg^{-1})

3.2.6.3 Cálculo dos Parâmetros de Imobilização

Este estudo compreendeu a obtenção e a caracterização dos derivados, no que se refere ao rendimento de imobilização e a retenção de atividade. Rendimento global e atividade recuperada foram definidas como segue:

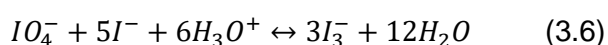
- a) Rendimento de Global (RG) - razão entre a atividade aparente (A_{AP}) e atividade enzimática inicialmente oferecida (A_{OF});
- b) Atividade Recuperada (AR) - razão entre a atividade aparente (A_{AP}) e atividade imobilizada teoricamente (A_{IMT}).

3.2.7 Caracterização do Suporte

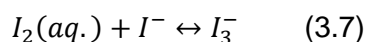
3.2.7.1 Quantificação de Grupos Aldeídos

A quantificação de grupos aldeídos formados por mililitro de suporte era feita por iodometria, segundo adaptação da metodologia de Pereira *et al.*, (2004), descrita a seguir.

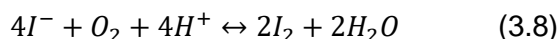
O periodato (IO_4^-) não consumido na reação de oxidação dos grupos gliceril (álcoois) reage com o iodeto (I^-) em excesso, gerando o íon tri-iodeto (I_3^-), o qual é quantificado por colorimetria:



É necessário iodeto em excesso para gerar o íon tri-iodeto (equação 3.6), pois o iodo na forma I_2 é muito volátil.



Em solução ácida há perda de iodo, por volatilização, devido à oxidação de iodeto por oxigênio atmosférico (equação 3.7). Assim, a quantificação do periodato de sódio não consumido era realizada em meio contendo bicarbonato de sódio, pois, a oxidação atmosférica de iodeto é desprezível em solução neutra (VOGEL, 1981).



Em uma cubeta de vidro, contendo 3 mL de uma solução 1 : 1 (v / v) de iodeto de potássio 10% e bicarbonato de sódio saturado, era adicionado 100 µL de uma solução aquosa de periodato, preparada nas mesmas condições da suspensão do suporte (substituindo suporte por água). Em um espectrofotômetro, fazia-se uma varredura de comprimentos de ondas, escolhendo-se aquela que fornecesse uma absorvância igual a 1 (423 nm para uma solução aquosa de periodato 0,01 M). Cem microlitros do sobrenadante final da oxidação eram posteriormente adicionados a 3 mL da solução 1 : 1 descrita anteriormente, correspondendo o decréscimo na absorvância à porcentagem de grupos aldeídos formados.

3.2.7.2 Adsorção de Nitrogênio (BET)

A adsorção pode ser enunciada, de maneira bastante simplificada, como um processo na qual uma substância gasosa, líquida ou sólida fica presa à superfície de um sólido (SKOOG *et al.*, 2008). De uma forma mais específica, pode-se caracterizar a adsorção como a variação da concentração de uma substância em uma interface, sendo que o espaço de interface é uma medida arbitrária da região limite entre duas substâncias não-miscíveis. Quando a concentração de uma substância aumenta em uma interface, ocorre o que se denomina de adsorção positiva. Quando a concentração desta substância diminuiu na região de interface, tem-se uma adsorção negativa. Porém, costuma-se tratar o fenômeno de adsorção apenas nos casos de adsorção positiva (NETZ e ORTEGA; 2002). A substância que sofre o aumento de concentração sobre a superfície da fase condensada é chamada de adsorbato. Já a fase condensada, na superfície da qual o processo ocorre, é chamada de adsorvente.

A técnica de adsorção de nitrogênio analisa as propriedades texturais dos materiais, área específica, volume, tamanho, distribuição e geometria do poro. Essa técnica também

revela a medida da área superficial que está relacionada com a micro, meso e macroporosidade.

Um dos métodos mais comuns de determinação da área específica de um sólido se baseia na determinação da quantidade necessária de adsorvato para formar uma monocamada sobre a superfície a ser medida. Os adsorvatos normalmente utilizados para esse fim são nitrogênio e argônio.

As isotermas de adsorção foram obtidas em um equipamento ASAP 2020 (Accelerated Surface Area and Porosimetry System) da Micromeritics para análise da sílica antes do tratamento químico e após o tratamento químico, comparando os suportes obtidos com diferentes concentrações de GPTMS. Esse equipamento possui dois sistemas de vácuos independentes: um para preparação da amostra e outro para análise. Este equipamento permite que uma amostra seja tratada e outra analisada simultaneamente. Com isso, a análise de BET foi dividida em duas etapas: a primeira etapa chamada de tratamento da amostra (desgaseificação) e a etapa posterior referente à análise da amostra (NETZ e ORTEGA; 2002).

A desgaseificação da amostra é o processo no qual a amostra é limpa antes da análise ser realizada, sendo então aquecida e colocada sob vácuo. Essa etapa é importante, pois a maioria dos materiais sólidos absorvem umidade e outros contaminantes quando expostos à atmosfera e, sendo analisados sem o devido tratamento, podem fornecer dados não confiáveis e danificação do equipamento. A etapa de desgaseificação consistiu em submeter as amostras a vácuo abaixo de 10^{-3} mmHg, a amostra sem GPTMS a 300 °C e as com GPTMS a 80 °C, durante 12 h.

Finalizada essa etapa, as amostras foram analisadas de modo a obter dados importantes, como: área específica, diâmetro e volume de poro.

3.2.7.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Visando verificar as modificações causadas pelo GPTMS na estrutura do suporte, foram realizadas análises de MEV. Estas análises foram realizadas no Complexo de Centrais de Apoio à Pesquisa da UEM (COMCAP).

3.2.8 Propriedades Catalíticas da Enzima β -Galactosidase Imobilizada

A enzima imobilizada, preparada pelo método indicado no item 3.2.5 foi caracterizada quanto: (a) à atividade em função do pH e da temperatura; e (b) à estabilidade térmica quando incubada em presença da solução de soro de leite em pó com 5 % (m/v) de lactose, pH 6,5 (ZANIN e MORAES, 1998).

a) *Atividade em Função do pH e da Temperatura*

A atividade da enzima imobilizada em função do pH e da temperatura foi determinada pelo método das velocidades iniciais (item 3.2.3) em reator batelada tipo cesta.

A faixa de pH testada foi de 6,0; 6,5; 7,0 e 7,5 e a temperatura de 30, 35, 40, 45 e 50 °C. Foi utilizada a solução tampão recomendada pela NOVO INDUSTRI S/A (NOVO, 1979 e MATIOLI *et al.*, 2001) descrita no item 3.1.2.

O ensaio era conduzido como descrito a seguir:

- 1) Preparava-se 500 mL de solução da solução de soro de leite em pó com 5 % (m/v) de lactose e 10 % de tampão de formulação especial em um determinado pH, por exemplo, pH 6,0;
- 2) Pegava-se aproximadamente, 12 g de enzima imobilizada (massa úmida), lavava-se com água destilada em funil de Büchner e deixava-se succionar por 20 minutos;
- 3) Em 7 cestas numeradas, pesava-se 1 g de enzima imobilizada (etapa 2) tendo-se o cuidado de anotar a massa exata. Em um cadinho de porcelana, pesava-se aproximadamente, 1 g de enzima imobilizada para determinação de umidade a 105 °C;
- 4) As cestas eram colocadas em um suporte, sendo em seguida imersas em um recipiente contendo solução tampão de formulação especial pH 6,5, onde permaneciam até a realização do teste;
- 5) Aquecia-se o banho a 30 °C, adicionava-se no reator batelada 50 mL da solução de lactose 5 % m/v, no pH do teste e aguardava-se 10 minutos para atingir o equilíbrio térmico. Retirava-se uma amostra de 0,5 mL para determinação da glicose pelo método GOD-PAD, conforme o item 3.2.1. Este era o branco;
- 6) Imergia-se a cesta número 1 no reator e acionava-se o cronômetro. Amostras de 0,5 mL eram retiradas a cada 5 minutos durante 30 minutos. Estas eram submetidas ao tratamento indicado no item 3.2.3;
- 7) Ajustava-se o banho para 35 °C, descartava-se a solução de lactose, lavava-se o reator com água, secava-se com papel absorvente e adicionava-se 50 mL de solução de lactose 5 % m/v no pH do teste. Aguardava-se o sistema atingir o equilíbrio térmico e então retirava-se uma amostra de 0,5 mL. Em seguida, imergia-se a cesta número 2 e acionava-se o cronômetro, retirando-se amostras a cada 5 minutos até completar o total de 30 minutos;
- 8) As etapas 6 e 7 eram repetidas até cobrir todas as temperaturas do ensaio: 30, 35, 40, 45 e 50 °C, num mesmo pH;

- 9) A atividade e a atividade específica foram calculadas, respectivamente, pelas equações 3.4 e 3.5.

b) Estabilidade Térmica da Enzima

A estabilidade térmica da enzima β -galactosidase imobilizada em presença de substrato (solução de soro de leite em pó com 5 % (m/v) de lactose e 10 % de tampão de formulação especial, pH 6,5) foi determinada nas temperaturas de 30 a 50 °C, com um intervalo de 5 °C.

O ensaio era conduzido como apresentado a seguir:

- 1) Aquecia-se o banho na temperatura do ensaio;
- 2) Pegava-se aproximadamente, 10 g de enzima imobilizada (massa úmida), lavava-se com água destilada em funil de Büchner e deixava-se succionar por 20 minutos;
- 3) Em 7 cestas numeradas, pesava-se aproximadamente 1 g de enzima (etapa 2), tendo-se o cuidado de anotar a massa exata. Em um cadinho de porcelana, pesava-se aproximadamente, 1 g de enzima imobilizada para determinação de umidade a 105 °C;
- 4) Adicionava-se no reator batelada 50 mL da solução de lactose 5 % m/v, no pH do teste e aguardava-se 10 minutos para atingir o equilíbrio térmico. Retirava-se uma amostra de 0,5 mL para determinação da glicose pelo método GOD-PAD, conforme o item 3.2.1. Este era o branco;
- 5) Imergia-se a cesta número 1 no reator (etapa 4) e as demais num béquer contendo 200 mL de solução de lactose termostatizada na temperatura de ensaio e acionava-se o cronômetro. A cada 40 minutos, retirava-se uma cesta do béquer, e determinava-se a estabilidade da enzima imobilizada, procedendo como nas etapas 6 a 8 a seguir;
- 6) Amostras de 0,5 mL eram retiradas, do reator batelada, a cada 5 minutos, durante 30 minutos. Estas eram submetidas ao tratamento indicado no item 3.2.3;
- 7) Terminada a reação, descartava-se a solução de lactose, lavava-se o reator com água, secava-se com papel absorvente e adicionava-se novos 50 mL de solução de lactose. Aguardava-se 5 minutos para atingir o equilíbrio térmico;
- 8) Retirava-se a cesta número 2, lavava-se num béquer contendo água na temperatura do ensaio, escorria-se a cesta por 2 minutos, sendo em seguida imersa no reator contendo 50 mL de solução de lactose já termostatizada. Procedia-se como nas etapas 6 e 7;
- 9) A etapa 8 era repetida até integralizar 240 minutos de incubação da enzima imobilizada (etapa 5);

- 10) A atividade e a atividade específica eram calculadas, respectivamente, pelas equações 3.4 e 3.5.

3.2.9 Tempo de Meia-Vida a 45 °C

Visando verificar a eficiência da reação de pós-imobilização com glutaraldeído e qual seria a melhor concentração a ser utilizada (0,1; 0,5; 1,0 ou 2,0 % m/v), foi determinado o tempo de meia-vida a 45 °C para os biocatalisadores preparados com diferentes concentrações de glutaraldeído na reação pós-imobilização, para o biocatalisador sem esta reação e para a enzima solúvel.

O tempo total de operação foi de 20 h. A solução de lactose a 5 % m/v, pH 6,5 era trocada a cada 2 horas de ensaio. O ensaio foi conduzido da mesma forma que o ensaio de estabilidade térmica, discutido no item 3.2.13.

O coeficiente de inativação térmica (kD) da enzima imobilizada, foi calculado pela equação 2.7 enquanto a energia de desnaturação (ED) foi calculada pela equação 2.3 (modelo exponencial).

3.2.10 Reações de Hidrólise da Lactose

Visando verificar a eficiência da imobilização enzimática, foram feitos testes de hidrólise da lactose de uma solução de soro de leite com a enzima solúvel; o biocatalisador produzido sem reticulação e o biocatalisador produzido com reticulação após a imobilização.

As condições de trabalho foram:

- a) Temperatura: 40 °C;
- b) Substrato: solução de soro de leite em pó com 0,5 % (m/v) de lactose em tampão de formulação especial, pH 6,5;
- c) Volume da solução de substrato: 50 mL;
- d) Reator utilizado: reator batelada (item 3.1.6), com a enzima imobilizada dentro de uma cesta;
- e) Quantidade de enzima β -galactosidase: 50 U/g lactose;
- f) Intervalo de tempo de amostragem: durante a primeira hora de reação, as amostras foram retiradas a cada 15 minutos, e após foram retiradas a cada uma hora até completar 25 horas. As amostras foram tratadas como indicado no item 3.2.4.1;
- g) O teor de glicose das amostras foi analisado com o kit GOD PAD, conforme o item 3.2.1.

A equação de conversão da lactose em glicose e galactose, foi deduzida com base na equação de HERNANDEZ e ASENJO (1982), e corresponde à equação 3.9:

$$X_A = 2 * \left[\frac{C_G - C_{GB}}{C_{L1}} \right] * \left[\frac{M_L}{M_G + M_A} \right] * 100 \quad (3.9)$$

Em que: C_G = concentração de glicose produzida (μmol) (conforme equação 3.1); C_{GB} = concentração de glicose presente no branco (mg L^{-1}); M_G = massa molecular da glicose (180 g); M_{GA} = massa molecular da galactose (180 g); M_L = massa molecular da lactose (342 g); X_A = conversão total de lactose em glicose e galactose (% total de hidrólise da lactose).

3.2.11 Estabilidade Operacional

A viabilidade da reutilização da β -galactosidase imobilizada com e sem a reação pós-imobilização com glutaraldeído foi analisada durante uma sequência de bateladas de reação de hidrólise de lactose.

As condições de reação foram:

- a) Temperatura: 40 °C;
- b) Tempo de reação: 10 h;
- c) Reator utilizado: reator batelada (item 3.1.6), com a enzima imobilizada dentro de uma cesta;
- d) Substrato: solução de soro de leite em pó com 5 % (m/v) de lactose em tampão de formulação especial, pH 6,5;
- e) Volume da solução de substrato: 50 mL;
- f) Quantidade de enzima β -galactosidase: 50 U/g de lactose.

Durante tempos pré-determinados, uma amostra de 10 μL dessa solução foi retirada e a quantidade de produto formada foi determinada pelo método GOD-PAD (item 3.2.1). A atividade foi calculada de acordo com o item 3.2.8.

A solução então foi filtrada, o biocatalisador foi lavado, seco e pesado para ser reutilizado novamente. A reação foi repetida até que a produção de glicose começasse a ficar constante com o tempo.

3.2.12 Produção de Galacto-oligossacarídeos

A metodologia utilizada para a síntese foi a proposta por Lisboa *et al.*, (2012). As reações de síntese enzimática de galacto-oligossacarídeos (GOS) foram realizadas

utilizando reator encamisado (item 3.1.6). Todos os experimentos de produção de galacto-oligosacarídeos foram realizados utilizando a enzima β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* imobilizada em sílica macroporosa e com reação de reticulação após a imobilização com 1,0 % de glutaraldeído. Os experimentos foram todos realizados em duplicata.

Para o reator batelada, a reação foi otimizada. As condições ensaiadas foram: diferentes tipos de tampão: tampão fosfato (50 mM), tampão de formulação especial (item 3.1.2, Tabela 3.2) e tampão acetato de sódio (0,1 M) todos em pH 6,5; concentração de lactose: 30, 40 e 50 % (m/v); temperatura: 40, 45 e 50 °C, quantidade de enzima: 90, 180 e 360 U/g de lactose. Utilizando as melhores condições obtidas para o reator batelada, foram realizados testes a fim de comparação nos reatores batelada alimentada e contínuo (CSTR).

Para a reação de síntese de GOS foram calculados os seguintes parâmetros: produtividade, rendimento de GOS e conversão máxima de lactose. Os valores foram determinados pelas equações a seguir (HSU *et al.*, 2007).

$$\text{Conversão da lactose (\%)} = \frac{LaC_{Inicial} - LaC_{Residual}}{LaC_{Inicial}} * 100 \quad (3.10)$$

$$\text{Rendimento (\%)} = \frac{GOS}{Gli+Gal+Lac+GOS} * 100 \quad (3.11)$$

$$\text{Produtividade} = \frac{\Delta GOS}{\Delta Tempo} \quad (3.12)$$

Em que: *Gal* = concentração de galactose (g L⁻¹); *Gli* = concentração de glicose (g L⁻¹); *Lac* = concentração de lactose (g L⁻¹); *LaC_{Inicial}* = lactose inicialmente presente no substrato (g L⁻¹); *LaC_{Residual}* = lactose presente no substrato (g L⁻¹); *GOS* = concentração de galacto-oligosacarídeos (g L⁻¹); ΔGOS = variação da concentração de galacto-oligosacarídeos (g L⁻¹); $\Delta Tempo$ = variação do tempo (horas).

3.2.12.1 Síntese em Reator Batelada

O ensaio foi conduzido como descrito a seguir:

- a) Preparava-se 50 mL solução de soro de leite em tampão de formulação especial na concentração desejada. Corrigia-se o pH para 6,5;
- b) Tomava-se uma quantidade de enzima imobilizada (EI) (massa úmida), lavava-se com água destilada em funil de Büchner e deixava-se succionar por 20 minutos. Utilizou-se a enzima preparada no item 3.2.5;

- c) Em uma cesta, pesava-se a massa de EI desejada. Em um cadinho de porcelana, pesava-se, aproximadamente, 1,000 g de EI para determinação da umidade a $105 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5 \text{ }^{\circ}\text{C}$;
- d) Aquecia-se o banho na temperatura desejada, adicionava-se 50 mL de solução de soro de leite na concentração a ser utilizada, pH 6,5 e aguardava-se 10 minutos para atingir o equilíbrio térmico. Retirava-se uma amostra de 0,5 mL. Este era o ponto zero da reação;
- e) Imergia-se a cesta no reator (Figura 3.2) e acionava-se o cronômetro. Amostras de 0,5 mL eram retiradas nos tempos de 8, 12, 24 e 48 horas;
- f) As amostras foram congeladas e depois então submetidas ao tratamento no item 3.2.13.

3.2.12.2 Síntese em Reator Batelada Alimentada

Visando aumentar o rendimento de produção de GOS, foi utilizado o processo batelada alimentada (Figura 3.4) adaptado de Vera *et al.*, (2014), como descrito a seguir:

- a) Pesou-se 0,5 g (massa seca) do biocatalisador em uma cesta.
- b) Preparou-se 8 L de solução de soro de leite em tampão de formulação especial, com 40 % de lactose, pH 6,5, mantida sob temperatura ambiente.
- c) Nos primeiros 45 min, operou-se o reator no modo batelada, conforme o item 3.2.12.1. Neste estágio, foram retiradas amostras somente no início e no fim.
- d) Após esse período foram ligadas as bombas de alimentação de substrato e retirada de produto, sob uma vazão de aproximadamente 500 g h^{-1} .
- e) Operou-se deste modo até durar todo substrato, ou seja, por 3 horas. Foram retiradas amostras a cada 15 min.
- f) Após este período, operou-se novamente o reator no modo batelada, por mais 3 h. Neste estágio, foram retiradas amostras a cada 1 h.
- g) Todas amostras foram congeladas e depois então submetidas ao tratamento no item 3.2.13.

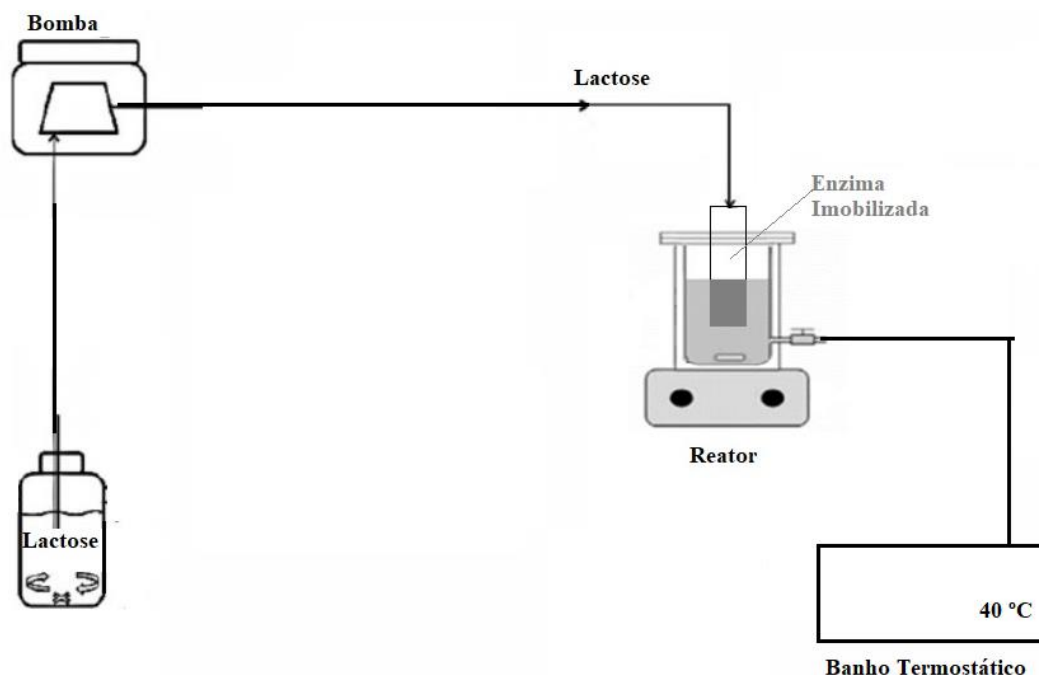


Figura 3.4 - Esquema do reator batelada alimentada.

Fonte: A autora.

3.2.12.3 Síntese em Reator Contínuo (CSTR)

Visando aumentar o rendimento de produção de GOS, foi utilizado o processo contínuo (Figura 3.5), como descrito a seguir:

- a) Pesou-se 0,5 g (peso seco) do biocatalisador;
- b) Preparou-se 10 L de solução de soro de leite em tampão de formulação especial, com 40 % de lactose e pH 6,5;
- c) Nos primeiros 45 min, operou-se o reator no modo batelada, conforme o item 3.2.12.1. Neste estágio foram retiradas amostras apenas no início e no fim.
- d) Após esse período foram ligadas as bombas de alimentação de substrato e retirada de produto, sob uma vazão de aproximadamente $0,05\text{g h}^{-1}$;
- e) Operou-se deste modo até durar todo substrato, ou seja, por 16 horas. Foram retiradas amostras a cada 1 h no início do processo e depois de 6 h, a cada 2 h
- f) Após este período, operou-se novamente o reator no modo batelada, por mais 48 h. Neste estágio, foram retiradas amostras nos períodos de 45 min; 12, 24 e 48 h;
- g) Todas amostras foram congeladas e depois, então, submetidas ao tratamento no item 3.2.13.

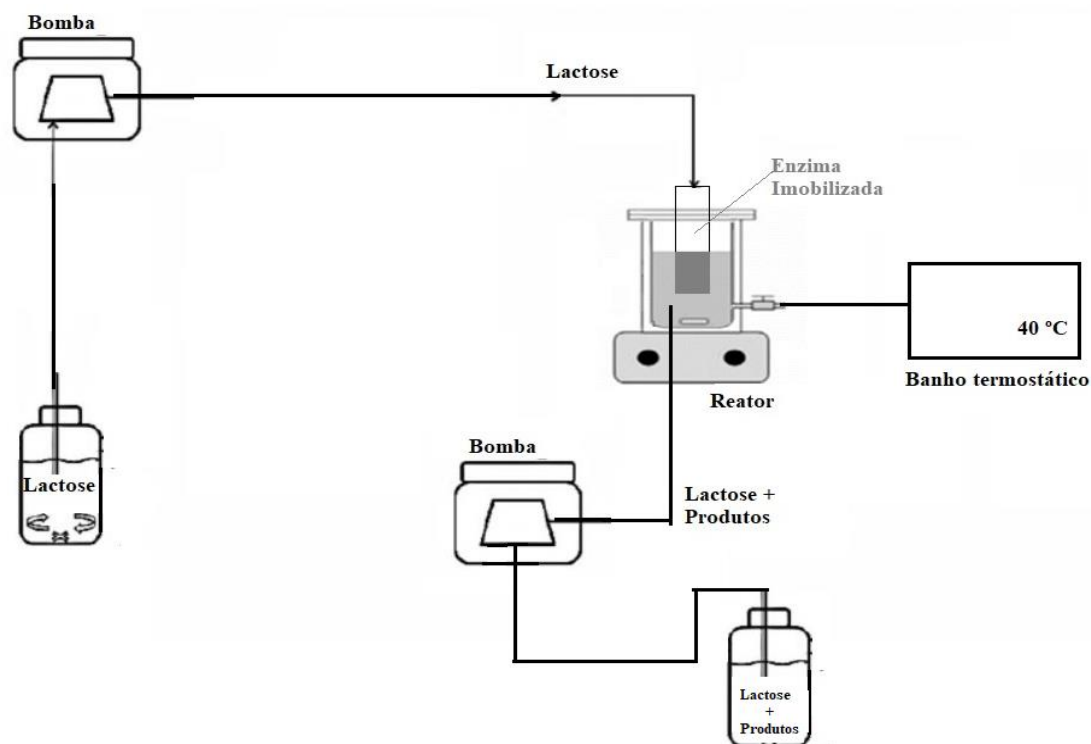


Figura 3.5 - Esquema do reator contínuo (CSTR).

Fonte: A autora.

3.2.13 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Os produtos obtidos foram analisados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), utilizando uma coluna Supelcogel™ Ca (300 x 7,8 mm). Foi utilizada água ultrapura como solvente a um fluxo de 0,5mL/min, a 65°C. Foram aplicados 20 µL das amostras e das soluções padrões, preparadas a 0,5% (m/v). O método para a análise cromatográfica foi adaptado de Santos, 2006 e Santos *et al.*, (2009).

3.2.13.1 Curva padrão

A curva de calibração foi construída utilizando os padrões de glicose, galactose e lactose. Foram preparadas soluções contendo os três padrões numa faixa de concentração de 0,16 a 3 g.L⁻¹.

3.2.13.2 Amostras

A identificação e quantificação dos açúcares foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Todas as amostras foram diluídas cem vezes. Padrões de

lactose, glicose e galactose foram usados para determinar os tempos de retenção. As concentrações do galacto-oligossacarídeo de menor cadeia molecular (GOS1) e do galacto-oligossacarídeo de maior cadeia molecular (GOS2) em g L^{-1} , foram estimadas usando um índice de refração médio, considerando os valores obtidos para lactose, glicose e galactose. A precisão desta suposição foi confirmada checando o balanço de massa da reação (VERA *et al.*, 2014).

A Figura 3.6 mostra um exemplo de cromatograma contendo apenas o substrato. Comparando-a com a Figura 3.7, pode-se observar que o galacto-oligossacarídeo GOS1 foi identificado no mesmo tempo de retenção que o tampão do substrato. Desta forma, a área do GOS1 foi determinada pela diferença com a área do tampão.

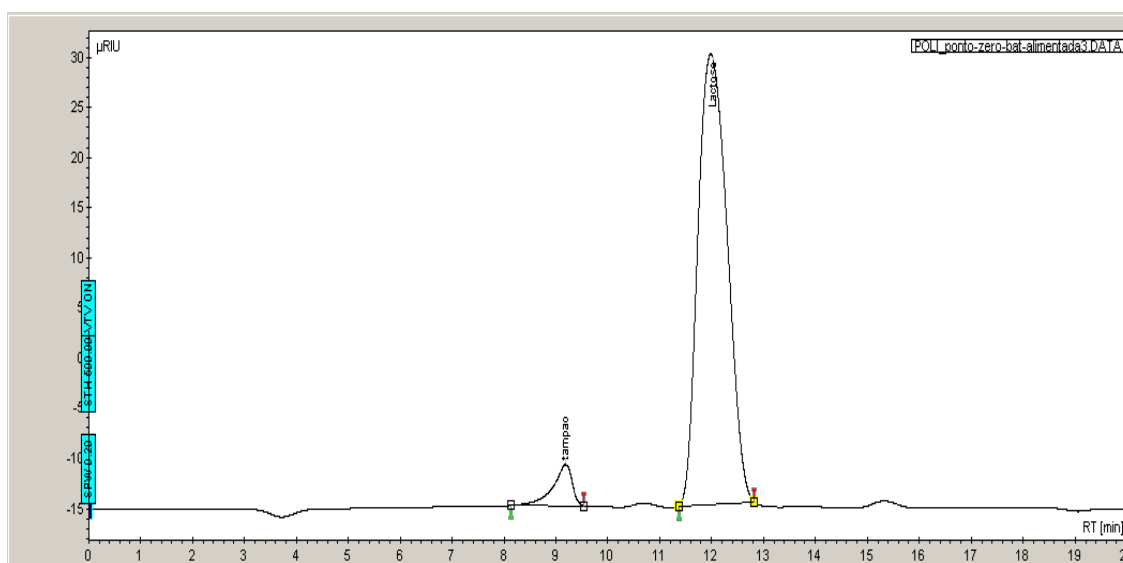


Figura 3.6 - Perfil cromatográfico do substrato (tempo zero), ensaio em reator batelada a 40 % de lactose (m/v) em soro de leite, 40 °C e pH 6,5.

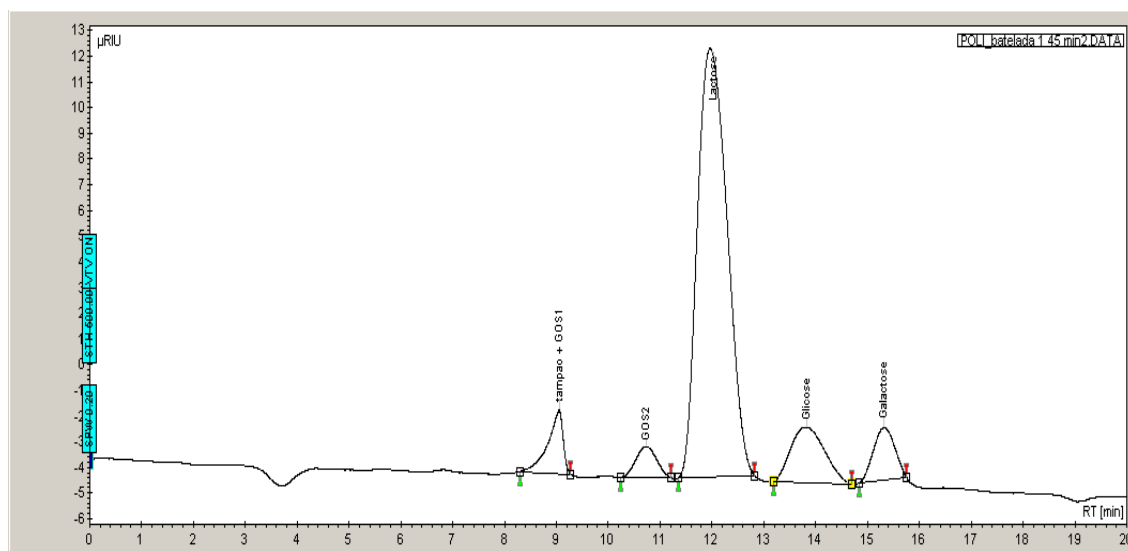


Figura 3.7 - Perfil cromatográfico de uma amostra (1,17 h de reação, ensaio em reator batelada a 40 % de lactose, 40 °C, pH 6,5, tempo 1,75 h.

4. CAPÍTULO IV - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste Capítulo são apresentados os principais resultados obtidos nos ensaios realizados. Note-se que o detalhamento dos resultados está apresentado nos Anexos. Nos Anexos também estão os artigos que serão submetidos em periódicos.

4.1 Obtenção das Curvas de Calibração de Glicose e Proteína

Neste item, apresenta-se um exemplo de curva de calibração utilizada para a dosagem de glicose nas amostras, bem como para a determinação do teor de proteína da enzima β -galactosidase.

4.1.1 Curva de Calibração de Glicose

A Figura 4.1 mostra um exemplo de dados de calibração obtidos para a dosagem da glicose, pelo método GOD-PAD (item 3.2.1).

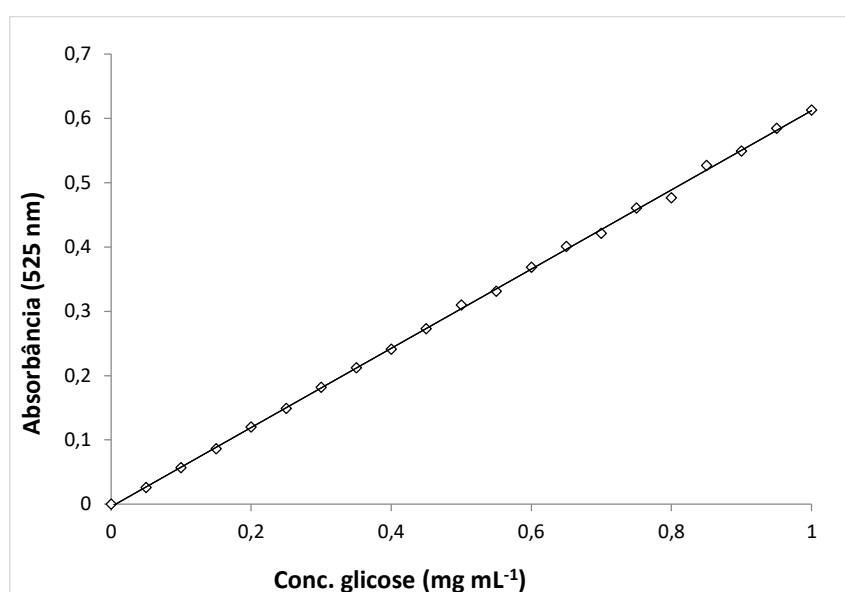


Figura 4.1 - Retas ajustadas para a dosagem de glicose pelo método GOD-PAD.

A reta ajustada obtida por regressão linear entre a absorbância (Ab) e a concentração conhecida de glicose (C), foi:

$$Ab = 0,6159 C - 0,0037, \quad r^2 = 0,9995$$

Em que: r^2 = coeficiente de correlação da reta ajustada.

4.1.2 Curva de Calibração de Proteína

Um exemplo de dados de calibração obtidos para a dosagem do teor de proteína pelo método descrito no item 3.2.2 é apresentado na Figura 4.2, sendo que a reta ajustada obtida da absorbância (Ab) em função da concentração conhecida de proteína (Cp), foi:

$$Ab = 13,06 Cp - 0,0802;$$

$$r^2 = 0,9905.$$

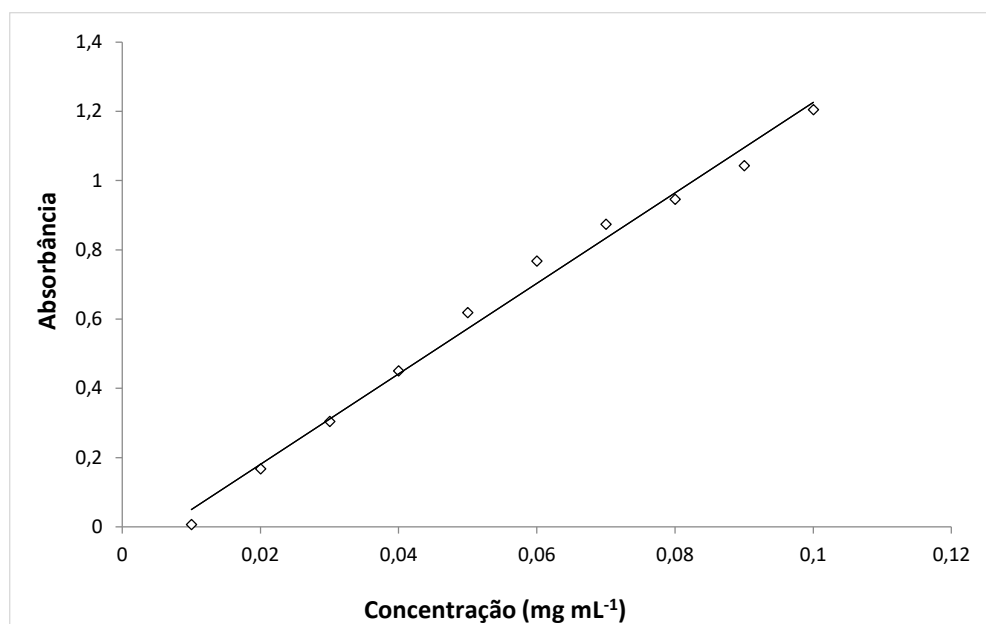


Figura 4.2 - Reta ajustada para a dosagem de proteína pelo método azul de Comassie.

4.2 Atividade Enzimática da β -Galactosidase Solúvel

A atividade da enzima β -galactosidase comercial de *Kluyveromyces lactis* (Lactozym[®] 2600 L) determinada pelo método descrito no item 3.2.3, a 45 °C e pH 6,5 foi igual a 1350,04 U mL⁻¹.

4.3 Propriedades Catalíticas da Enzima β -Galactosidase Solúvel

Nesta seção são apresentados e discutidos os resultados obtidos na caracterização da enzima β -galactosidase solúvel, quanto às seguintes propriedades: (a) atividade em função do pH e temperatura e (b) estabilidade térmica.

4.3.1 Atividade Específica em Função do pH e da Temperatura

Na Tabela 4.1 estão apresentados os resultados obtidos para a atividade específica em cada ensaio, enquanto na Figura 4.3 o comportamento da atividade específica em função do pH e da temperatura. Os maiores valores da atividade foram encontrados em pH 6,5, com exceção da temperatura de 50 °C, e os menores resultados foram determinados em pH 7,5, observados na temperatura de 50 °C. Em função da temperatura, os maiores valores de atividade ocorreram em 45 °C, alcançando a atividade máxima igual a 1350,04 U mL⁻¹ e atividade específica 2,65 U mg⁻¹, obtida em pH 6,5 e 45 °C. Os resultados apresentam consonância com os dados anteriormente descritos na Tabela 2.3 e com os resultados da literatura.

Tabela 4.1 - Resultados da atividade específica da enzima β-galactosidase solúvel em função do pH e da temperatura.

Temperatura (°C)	Atividade Específica (U mg ⁻¹)			
	pH			
	6,0	6,5	7,0	7,5
30	1,19 ± 0,0071	1,57 ± 0,0157	1,33 ± 0,0148	0,98 ± 0,0189
35	1,23 ± 0,0140	1,73 ± 0,0201	1,67 ± 0,0202	1,25 ± 0,0251
40	1,65 ± 0,0184	2,25 ± 0,0170	1,98 ± 0,0308	1,53 ± 0,0262
45	1,61 ± 0,0157	2,65 ± 0,0253	2,34 ± 0,0122	1,67 ± 0,0210
50	0,87 ± 0,0200	1,84 ± 0,0155	2,36 ± 0,0054	1,65 ± 0,0169

Matioli *et al.*, (2001), encontraram atividade máxima da enzima em pH 6,5 na temperatura de 45 °C, os maiores valores da atividade também foram encontrados em 45 °C. Em relação ao pH também houve coerência, visto que as maiores atividades foram determinadas em pH 6,5. O pH ótimo encontrado foi compatível também com o apresentado por Otieno (2010), que determinou pH 6,5 como o ótimo para essa enzima.

Jurado *et al.*, (2004), em seu estudo sobre enzimas comerciais, concluíram que os valores ótimos de pH e temperatura para a β-galactosidase comercial de *Kluyveromyces lactis* e encontram entre pH 6,5 e 7,0 e 35 e 45 °C, respectivamente. Campello *et al.*, (2012) também estudaram a influência do pH e da temperatura para a enzima β-galactosidase comercial de *Kluyveromyces lactis*, encontrando pH ótimo de 6,6 e temperatura ótima de 45 °C, os maiores valores da atividade observados entre 37 e 45 °C, enquanto acima de 45 °C, a atividade sofreu queda acentuada devido à desnaturação da proteína. Gékas &

Lopez-Leiva (1985) obtiveram pH ótimo entre 6,9 e 7,3 e temperatura ótima 37 °C, para a mesma enzima.

Nas Figuras 8.1 a 8.4 (Capítulo VIII – Anexo) são mostrados os gráficos de concentração de glicose em função do tempo para os diferentes valores de pH analisados.

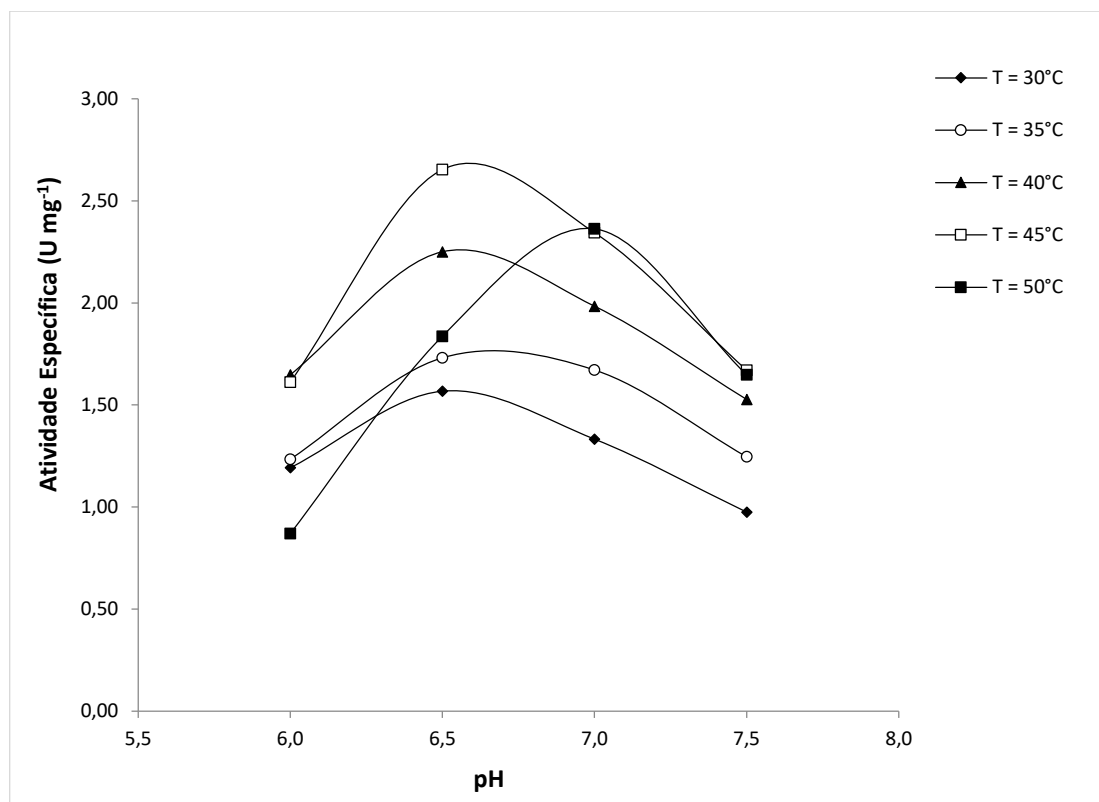


Figura 4.3 - Atividade específica da enzima β -galactosidase solúvel em função do pH e da temperatura.

4.3.2 Estabilidade Térmica

A Tabela 4.2 apresenta os resultados obtidos para a estabilidade térmica e a Figura 4.4, o gráfico do comportamento da estabilidade da enzima em função da temperatura em pH 6,5, no qual observa-se que nas temperaturas de 30 e 35 °C a enzima mostrou-se bem estável durante todo o ensaio. A 50 °C, após 120 minutos a enzima estava praticamente inativa. Na temperatura de 45 °C, a enzima perdeu 20,15 % de sua atividade após 120 minutos e 35,82 % após 240 minutos. A 40 °C, a enzima perdeu 11,06 % de sua atividade após 120 minutos e 14,04 % após 240 minutos.

Embora a maior atividade da enzima tenha sido encontrada a 45 °C, a mesma sofreu inativação térmica em pouco tempo nessa temperatura, portanto sua aplicação em longas reações deve ser realizada em temperaturas inferiores a 45 °C. Os gráficos os

ensaios de estabilidade térmica da enzima estão nas Figuras 8.6 a 8.9 (Capítulo VIII - Anexo).

Os resultados encontrados por Mاتيoli *et al.*, (2003), também mostraram que, apesar da atividade máxima ser encontrada a 45 °C, a temperatura recomendada para processos de longa duração é 40 °C, por apresentar-se mais estável e com atividade específica apenas 10,00 % menor que a 45 °C.

Tabela 4.2 - Resultados de estabilidade térmica da enzima β -galactosidase solúvel, valores da atividade específica em função da temperatura.

Temperatura (°C)	Atividade Específica (U mg ⁻¹)						
	Tempo (minutos)						
	0	40	80	120	160	200	240
30	1,55 ±	1,56 ±	1,64 ±	1,59 ±	1,60 ±	1,62 ±	1,56 ±
	0,0200	0,0153	0,0153	0,0116	0,0200	0,0105	0,0179
35	1,77 ±	1,66 ±	1,75 ±	1,72 ±	1,66 ±	1,67 ±	1,63 ±
	0,0170	0,0134	0,0129	0,0144	0,0156	0,0104	0,0197
40	2,35 ±	2,10 ±	2,06 ±	2,09 ±	2,07 ±	1,97 ±	2,02 ±
	0,0150	0,0098	0,0159	0,0100	0,0158	0,0087	0,0159
45	2,68 ±	2,46 ±	2,34 ±	2,14 ±	1,84 ±	1,73 ±	1,72 ±
	0,0170	0,0208	0,0100	0,0100	0,0200	0,0153	0,0152
50	1,80 ±	0,60 ±	0,35 ±	0,07 ±	0,01 ±	0,01 ±	0,00 ±
	0,0160	0,0066	0,0182	0,0057	0,0050	0,0096	0,0045

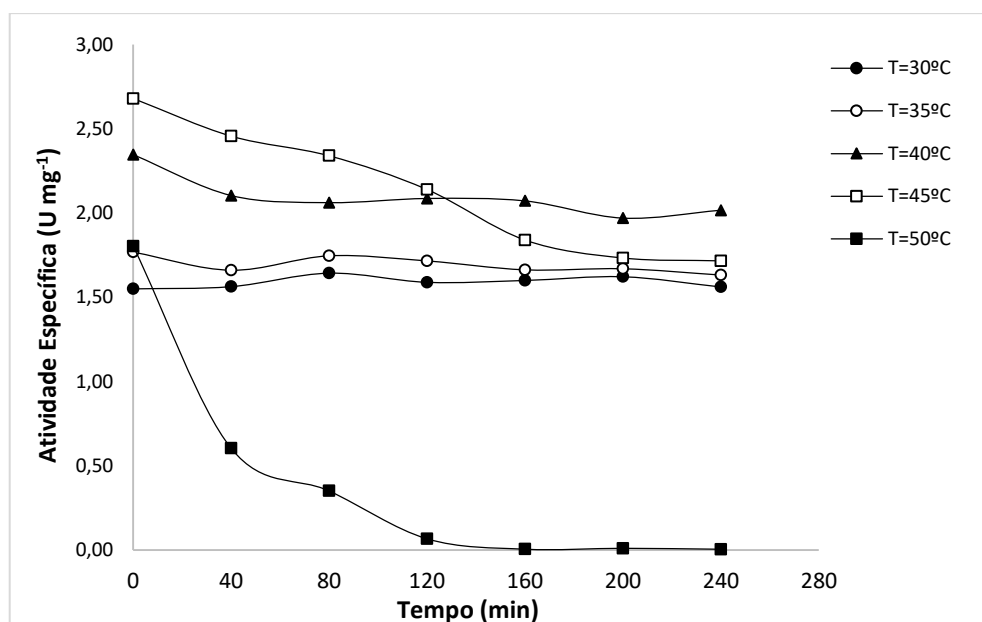


Figura 4.4 - Estabilidade térmica da enzima β -galactosidase solúvel.

4.4 Imobilização Enzimática

Na Tabela 4.3 apresentam-se os resultados da imobilização da enzima, de acordo com a metodologia apresentada por Bernal *et al.*, (2014) e as modificações descritas na seção 3.2.5.

De acordo com a Tabela 4.3, as melhores condições de imobilização foram na presença de 1,0 % de GPTMS a 20 °C, por 48 h de reação e com reticulação de 1,0 % de glutaraldeído. O rendimento da imobilização foi de 147,00 %. Em concentrações mais altas de GPTMS, a atividade do biocatalisador obtido foi praticamente nula. A concentração mais alta provavelmente ocasionou distorção da enzima, resultando em uma atividade recuperada quase nula, devido à alta reatividade do GPTMS, o qual pode ser polimerizado sobre a superfície do suporte, prejudicando a difusão do substrato, bem como distorcendo o centro ativo da enzima durante a imobilização (ALONSO *et al.*, 2005). Diminuindo a concentração de GPTMS, foram obtidos melhores resultados de atividade da enzima imobilizada e quantidade de enzima fixada ao suporte. A temperatura de 20 °C e o tempo de reação de 48 h permitiram a ativação da enzima já imobilizada.

Foi testada a quantidade de enzima nessa melhor condição já obtida. Testou-se 0,5, 1 e 2 mL de enzima. O melhor resultado foi com a quantidade de 1 mL de enzima.

A influência da carga protéica sobre a atividade aparente da enzima imobilizada também foi investigada. Analisando a Figura 4.5., pode-se concluir que a sílica pode ser carregada com cerca de 21 mg de proteína por grama de suporte. Este resultado mostra que o suporte possui grande área específica, sugerindo alta porosidade. No entanto, a

eficácia (razão entre a atividade aparente e a atividade imobilizada) diminui à medida que a quantidade de proteína imobilizada aumenta. Este comportamento é comum em enzimas imobilizadas, particularmente quando a proteína é grande como a β -galactosidase de *Kluyveromices lactis*, que tem massa molecular de 115 kDa (Tabela 2.3). O aumento de moléculas grandes dentro dos poros diminui as taxas de difusão intra-partículas de substratos e produtos. Desta forma, as restrições difusionais são frequentemente observadas observadas em biocatalisadores altamente carregados.

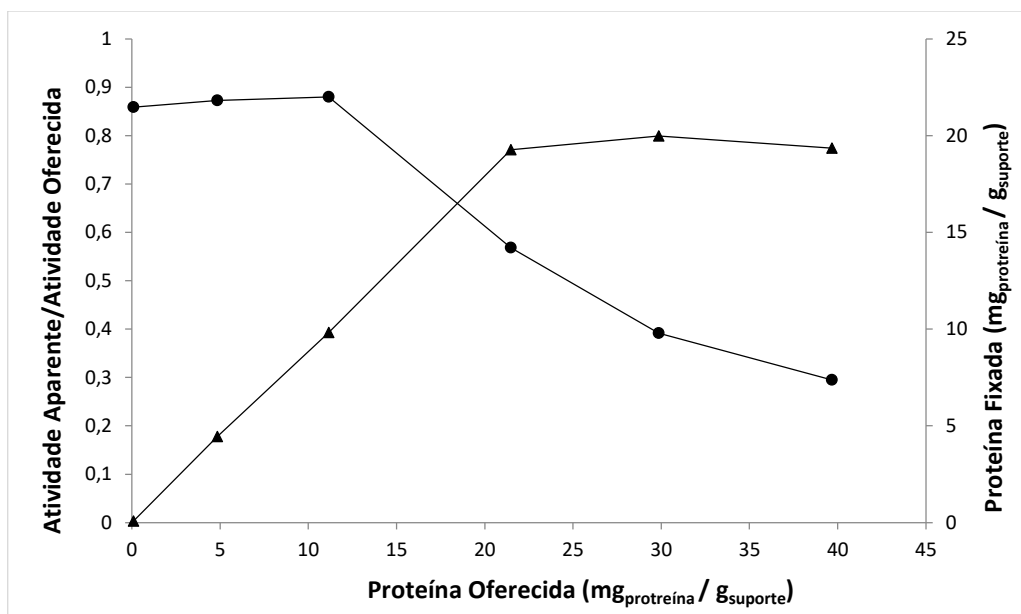


Figura 4.5 - Carregamento de proteína na imobilização da enzima β -galactosidase em sílica (▲) e Fator de efetividade (relação entre a atividade aparente e a atividade oferecida) (●). Condições de imobilização: 1,0 % GPTMS, silanização a 60 °C, $IO_4 = 0,03$ M, 20 °C, 48 h de reação, 1 mL de enzima, pH 7.0

Tabela 4.3 - Resultados de imobilização da enzima β -galactosidase, sob diferentes condições.

Quantidade de GPTMS (%)	Condições de imobilização	Proteína Fixada (mg/g suporte seco)	Perc. de Fixação (%)	Perc. de Fixação (%) desvio	Perc. de Fixação (%) média	A _{OF} (U/g suporte seco)	A _{AP} (U/g suporte seco)	A _{AP} (U/g suporte seco) desvio	A _{AP} (U/g suporte seco) média	A _{IMT}	AR (%)	AR Desvio	AR Média (%)	Rend. Global (%)	Rend. Global Desvio	Rend. Global Médio (%)
10,00	4°C, 48h, 1 mL de enzima, pH 10,0	0,00	0,00	0,00	0,00	2241,3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
		0,00	0,00			1358,5	0,00			0,00	0,00					
10,00	20°C, 48h, 1mL de enzima, pH 7,0	0,00	0,00	0,00	0,00	1358,5	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
		0,00	0,00			1358,5	0,00			0,00	0,00					
1,00	20°C, 24h, 1mL de enzima, pH 7,0	1,77	16,35	0,10	16,28	1358,5	180,49	1,51	179,42	222,14	81,25	0,16	81,14	13,29	0,11	13,21
		1,75	16,20			1358,5	178,35			220,13	81,02			13,13		
1,00	20°C, 48h, 0,5mL de enzima, pH 7,0	4,54	84,39	0,31	84,17	679,25	424,25	0,76	423,72	573,20	74,01	0,14	74,11	62,46	0,11	62,38
		4,50	83,96			679,25	423,18			570,27	74,21			62,30		
1,00	20°C, 48h, 2mL de enzima, pH 7,0	19,08	87,85	0,06	87,80	2717	1434,25	1,59	1433,13	2386,76	60,09	0,02	60,08	52,79	0,06	52,75
		19,03	87,75			2717	1432,00			2384,30	60,06			52,71		
1,00	20°C, 48h, 1mL de enzima, pH 7,0	9,42	87,55	0,11	87,47	1358,5	1434,25	1,59	1433,13	1189,32	120,59	0,01	120,60	105,58	0,12	105,49
		9,40	87,40			1358,5	1432,00			1187,30	120,61			105,41		
1,00	20°C, 72h, 1mL de enzima, pH 7,0	9,16	84,81	0,53	84,44	1358,5	1332,01	0,09	1332,08	1152,21	115,60	0,74	116,13	98,05	0,01	98,05
		9,08	84,06			1358,5	1332,14			1142,02	116,65			98,06		

(Continua na próxima página)

Tabela 4.3 - Resultados de imobilização da enzima β -galactosidase, sob diferentes condições (continuação).

Quantidade de GPTMS (%)	Condições de imobilização	Proteína Fixada (mg/g suporte seco)	Perc. de Fixação (%)	Perc. de Fixação (%) desvio	Perc. de Fixação (%) média	A _{OF} (U/g suporte seco)	A _{AP} (U/g suporte seco)	A _{AP} (U/g suporte seco) desvio	A _{AP} (U/g suporte seco) média	A _{IMT}	AR (%)	AR Desvio	AR Média (%)	Rend. Global (%)	Rend. Global Desvio	Rend. Global Médio (%)
1,00	4°C, 48h, 1mL de enzima, pH 10,0	1,81	16,98	0,13	16,89	1358,5	237,98	0,81	237,41	230,66	103,17	0,46	103,50	17,52	0,06	17,48
		1,79	16,79			1358,5	236,84			228,12	103,82			17,43		
1,00	20°C, 48h, 1mL de enzima, pH 7,0 reticulação com 0,1% de glutaraldeído	9,65	90,19	0,20	90,05	1358,5	1930,25	0,61	1930,69	1225,19	157,55	0,40	157,83	142,09	0,05	142,12
		9,62	89,91			1358,5	1931,12			1221,38	158,11			142,15		
1,00	20°C, 48h, 1mL de enzima, pH 7,0 reticulação com 0,5% de glutaraldeído	9,75	91,12	0,13	91,03	1358,5	1946,52	1,20	1947,37	1237,89	157,25	0,33	157,48	143,28	0,09	143,35
		9,73	90,93			1358,5	1948,21			1235,35	157,71			143,41		
1,00	20°C, 48h, 1mL de enzima, pH 7,0 reticulação com 1,0% de glutaraldeído	9,95	92,99	0,12	93,07	1358,5	1997,21	0,24	1997,04	1263,28	158,10	0,22	157,94	147,02	0,02	147,00
		9,97	93,16			1358,5	1996,87			1265,56	157,79			146,99		
1,00	20°C, 48h, 1mL de enzima, pH 7,0 reticulação com 1,5% de glutaraldeído	8,65	80,84	0,07	80,89	1358,5	1348,05	0,60	1347,63	1098,23	122,75	0,15	122,64	99,23	0,04	99,20
		8,66	80,93			1358,5	1347,20			1099,50	122,53			99,17		
1,00	20°C, 48h, 1mL de enzima, pH 7,0 reticulação com 2,0% de glutaraldeído	8,34	77,94	0,13	78,03	1358,5	1182,20	1,31	1183,13	1058,87	111,65	0,06	111,61	87,02	0,10	87,09
		8,36	78,12			1358,5	1184,05			1061,28	111,57			87,16		
0,50	20°C, 48h, 1mL de enzima, pH 7,0	4,81	44,70	0,20	44,56	1358,5	302,08	0,21	301,93	607,28	49,74	0,19	49,87	22,24	0,02	22,23
		4,78	44,42			1358,5	301,78			603,50	50,01			22,21		

4.5 Propriedades Catalíticas da Enzima β -Galactosidase Imobilizada

Apresentam-se a seguir os resultados de caracterização para a enzima imobilizada pelo método descrito no item 3.2.5.

4.5.1 Atividade em Função do pH e da Temperatura

Na Tabela 4.4 são apresentados os resultados obtidos para a atividade da enzima imobilizada sem reticulação (nas melhores condições obtidas anteriormente: 1,0 % GPTMS, silanização a 60 °C, $IO_4 = 0,03$ M, 20 °C, 48 h de reação, 1 mL de enzima, pH 7.0) em cada ensaio, enquanto na Figura 4.6 o comportamento da atividade específica em função do pH e da temperatura. Os maiores valores da atividade foram encontrados em pH 6,5, com exceção da temperatura de 50 °C, e os menores resultados foram determinados em pH 7,5. Em função da temperatura, os maiores valores de atividade ocorreram em 45 °C, alcançando a atividade máxima igual a 2,79 U mg⁻¹ obtida em pH 6,5.

Estes resultados indicam que a imobilização afetou positivamente a atividade enzimática, com uma recuperação de atividade em torno de 105,00 %. Nas Figuras 8.10 a 8.13 (Capítulo VIII – Anexo) são mostrados os gráficos de concentração de glicose em função do tempo para os diferentes valores de pH analisados.

Tabela 4.4 - Resultados da atividade específica da enzima β -galactosidase imobilizada em função do pH e da temperatura.

Temperatura (°C)	Atividade Específica (U mg ⁻¹)			
	pH			
	6,0	6,5	7,0	7,5
30	1,26 ± 0,0103	1,64 ± 0,0050	1,35 ± 0,0199	1,08 ± 0,0074
35	1,29 ± 0,0172	1,82 ± 0,0151	1,76 ± 0,0103	1,29 ± 0,0190
40	1,74 ± 0,0051	2,44 ± 0,0067	2,06 ± 0,0056	1,63 ± 0,0302
45	1,72 ± 0,0064	2,79 ± 0,0055	2,44 ± 0,0051	2,06 ± 0,0163
50	0,91 ± 0,0251	2,24 ± 0,0064	2,17 ± 0,0071	1,67 ± 0,0152

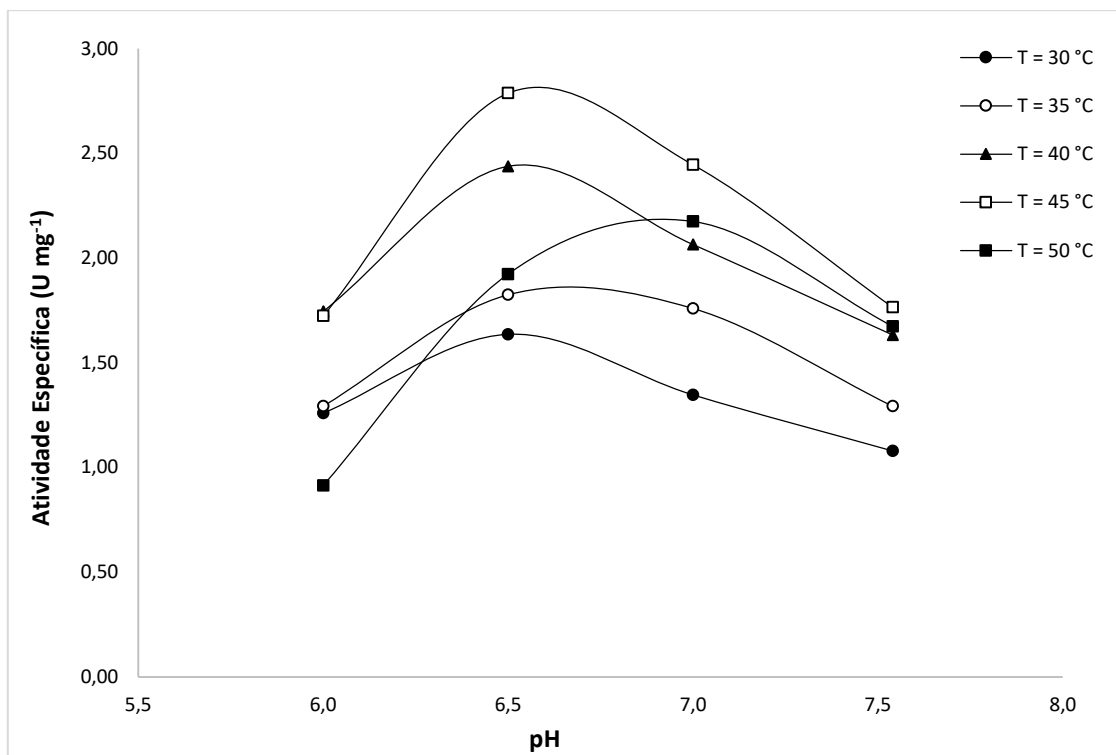


Figura 4.6 - Atividade específica da enzima β -galactosidase imobilizada em função do pH e da temperatura.

4.5.2 Estabilidade Térmica da Enzima β -Galactosidase Imobilizada

Na Tabela 4.5 e na Figura 4.7 são apresentados os resultados de estabilidade térmica para enzima imobilizada, nas melhores condições da Tabela 4.3. Como pode-se observar, houve um aumento pequeno da estabilidade da enzima imobilizada em relação à enzima solúvel nas temperaturas de 40 e 45 °C, que são as temperaturas de interesse para a produção de galacto-oligosacarídeos.

Dessa forma, procedeu-se com a reação de reticulação pós-imobilização com glutaraldeído, conforme o item 3.2.5.3, visando aumentar a estabilidade térmica da enzima. Os resultados são apresentados a seguir.

Os resultados que originaram os dados mostrados na Tabela 4.5 e na Figura 4.7, estão apresentados nas Figuras 8.14 a 8.18 (Capítulo VIII - Anexo).

Tabela 4.5 - Resultados da estabilidade térmica da enzima β -galactosidase imobilizada, valores da atividade específica em função da temperatura.

Temperatura (°C)	Atividade Específica (U mg ⁻¹)						
	Tempo (minutos)						
	0	40	80	120	160	200	240
30	1,67 ± 0,0173	1,63 ± 0,0153	1,66 ± 0,0100	1,65 ± 0,0100	1,65 ± 0,0195	1,69 ± 0,0153	1,68 ± 0,0121
35	1,84 ± 0,0153	1,80 ± 0,0153	1,86 ± 0,01800	1,87 ± 0,0153	1,87 ± 0,0200	1,81 ± 0,0100	1,83 ± 0,0137
40	2,51 ± 0,0115	2,45 ± 0,0200	2,44 ± 0,0142	2,44 ± 0,0100	2,44 ± 0,0100	2,33 ± 0,0152	2,32 ± 0,0111
45	2,70 ± 0,0100	2,65 ± 0,0180	2,61 ± 0,0200	2,55 ± 0,0152	2,34 ± 0,0112	2,15 ± 0,0102	2,16 ± 0,0115
50	1,93 ± 0,0107	1,06 ± 0,0182	0,80 ± 0,0076	0,46 ± 0,0058	0,26 ± 0,0045	0,13 ± 0,0058	0,02 ± 0,0057

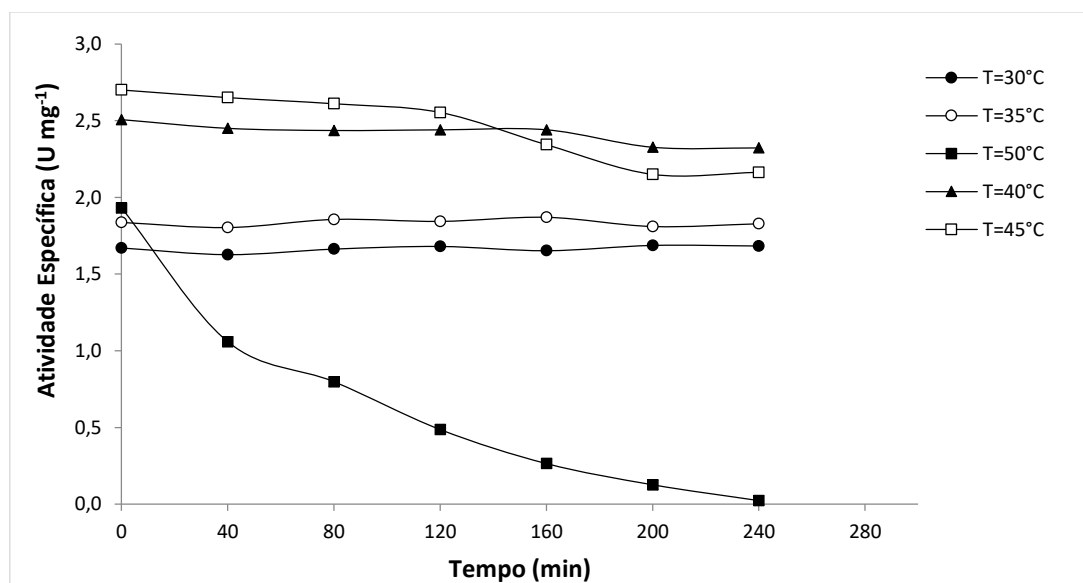


Figura 4.7 - Estabilidade térmica da enzima β -galactosidase imobilizada.

4.6 Reação Pós-Imobilização

Na Tabela 4.6 são apresentados os resultados de atividade aparente do biocatalisador imobilizado, sob as melhores condições da Tabela 4.3 (1,0 % GPTMS, silanização a 60 °C, $\text{IO}_4 = 0,03 \text{ M}$, 20 °C, 48 h de reação, 1 mL de enzima, pH 7.0), e com reticulação na reação pós-imobilização. A enzima foi imobilizada e reticulada conforme o item. 3.2.5.3, utilizando diferentes concentrações de glutaraldeído. A partir dos dados mostrados na Tabela 4.3, pode-se observar que a reticulação com glutaraldeído, aumentou em até 39,35 % a atividade aparente do biocatalisador obtido.

De acordo com a Figura 4.8, conclui-se que à medida que aumenta a quantidade de glutaraldeído, a estabilidade térmica aumenta. A relação entre a atividade do biocatalisador e a quantidade de glutaraldeído utilizado foi proporcional até 1,0 %. Com valores superiores a esse, o adicional de glutaraldeído diminui a atividade. Este fato pode ser explicado, pois o excesso de glutaraldeído enrijeceu as moléculas de enzimas, diminuindo suas atividades. Por isso, a quantidade utilizada em todos outros experimentos foi de 1,0 %.

Considerando-se os resultados de estabilidade térmica e rendimento de imobilização, optou-se por utilizar a concentração de 1,0 % nos próximos ensaios.

Os resultados obtidos para estabilidade estão de acordo com os trabalhos de Haider e Husain (2007) e Guidini *et al.*, (2011) que observaram alta estabilidade térmica da enzima β -galactosidase imobilizada em alginato de cálcio e resina de troca iônica respectivamente, e submetida ao processo de ligação cruzada utilizando o glutaraldeído como agente reticulante.

Tabela 4.6 – Resultados de atividade específica da enzima β -galactosidase imobilizada em função da quantidade de agente reticulante utilizado na reação de pós-imobilização.

Quantidade de Glutaraldeído (%)	Atividade Específica (U mg^{-1})	Atividade Recuperada Média (%)	Rendimento Global Médio (%)
0	$2,79 \pm 0,0055$	$120,54 \pm 0,01$	$105,49 \pm 0,12$
0,1	$4,21 \pm 0,0200$	$157,83 \pm 0,40$	$142,12 \pm 0,05$
0,5	$4,24 \pm 0,0075$	$157,48 \pm 0,33$	$145,35 \pm 0,09$
1,0	$4,35 \pm 0,0114$	$157,94 \pm 0,22$	$147,00 \pm 0,02$
1,5	$2,93 \pm 0,0193$	$122,64 \pm 0,15$	$99,20 \pm 0,04$
2,0	$2,56 \pm 0,0144$	$111,61 \pm 0,06$	$87,09 \pm 0,10$

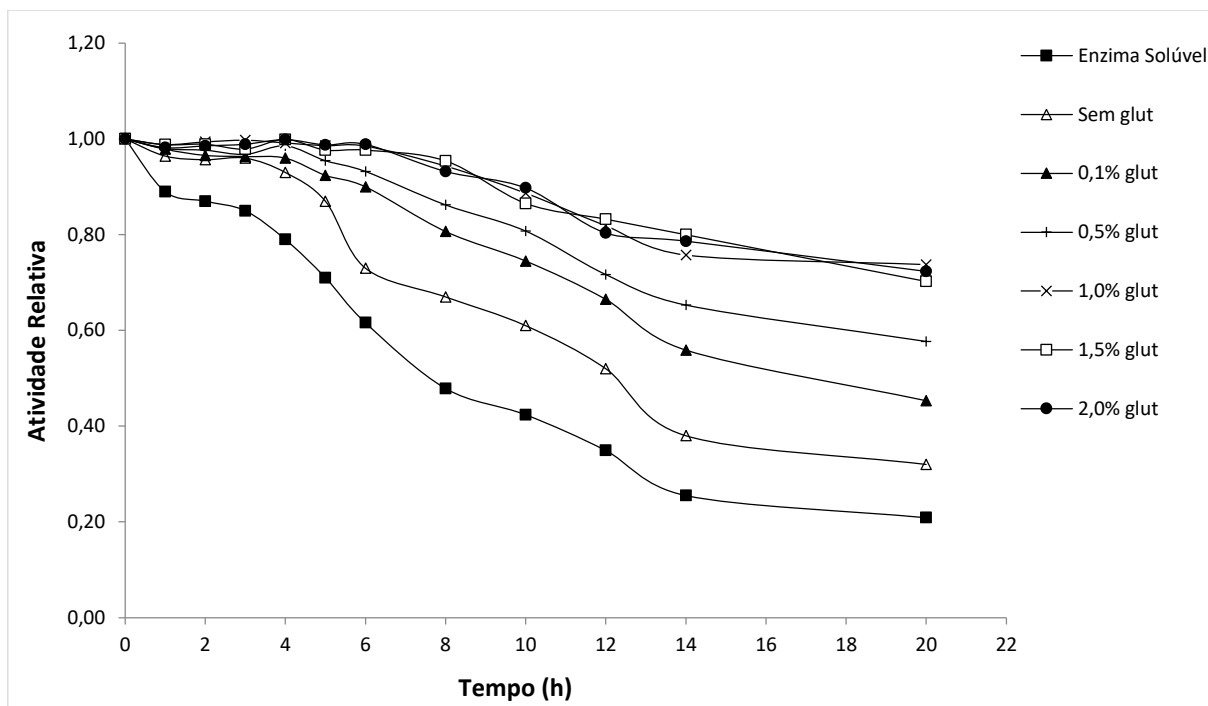


Figura 4.8 - Estabilidade térmica a 45 °C da enzima β -galactosidase imobilizada sob diferentes concentrações de glutaraldeído na reticulação.

4.7 Tempo de Meia-Vida da Enzima β -Galactosidase Imobilizada

O coeficiente de inativação térmica (k_d) da enzima β -galactosidase imobilizada pelo método descrito no item 3.2.6, foi calculado pela equação 2.6, e o tempo de meia-vida pela equação 2.7 (modelo exponencial). Estes resultados são apresentados na Tabela 4.7 e foram obtidos a partir dos dados apresentados na Figura 4.8. Os gráficos através dos quais foram obtidos os dados da Tabela 4.7, encontram-se nas Figuras 8.19 a 8.21 (Capítulo VIII - Anexo).

Observando os resultados para o tempo de meia-vida apresentados na Tabela 4.7, pode-se verificar que os resultados obtidos, a partir de dados experimentais, são condizentes com os dados teóricos apresentados nela apresentados.

A alta estabilidade do biocatalisador obtido com reticulação, deve-se à alta rigidez da molécula de enzima imobilizada, promovida pela estabilização das subunidades da enzima.

Estes dados, confirmam o fato de que na produção de GOS, é necessário utilizar o biocatalisador imobilizado e reticulado com glutaraldeído.

Tabela 4.7 - Coeficiente de desnaturação térmica e tempo de meia-vida da enzima β -galactosidase imobilizada – solução de lactose 5 % (m/v) em soro de leite – pH 6,5.

Enzima	Equação de Ajuste $y = \ln (A_i/A_{i0})$ t = tempo (min)	Coeficiente de Correlação (r^2)	k_d (h^{-1})	Tempo de Meia-vida, Modelo Exponencial (horas)
Solúvel	$y = 0,0692 - 0,0014x$	0,9717	0,084	8,25
Imobilizada sem glutaraldeído na reação pós- imobilização	$y = 0,0963 - 0,0011x$	0,947	0,066	10,5
Imobilizada com glutaraldeído na reação pós- imobilização	$y = 0,0633 - 0,0004x$	0,9038	0,024	28,9

4.8 Quantificação dos Grupos Aldeídos

Na Tabela 4.8 são apresentados os resultados da quantificação de aldeídos conforme descrito no método do item 3.2.5.7. De acordo com estes dados, pode-se concluir que a sílica modificada com 1,0 % de GPTMS foi a que mais formou grupos aldeídos aptos a se ligar com a enzima, confirmando os dados obtidos na Tabela 4.3.

Tabela 4.8 - Relação entre o número de grupos aldeídos oferecidos e formados para as diferentes concentrações de glutaraldeído utilizado na reação de pós-imobilização.

Quantidade de GPTMS (%)	Número de grupos aldeídos oferecidos (nmol aldeídos/g suporte)	Número de grupos aldeídos formados (nmol aldeídos/g suporte)
0,5	0,5	0,025
1,0	1,0	0,95
1,5	3,0	0,09
10,0	6,0	0,6

4.9 Adsorção de Nitrogênio

Os resultados das propriedades texturais, determinados a partir das medidas de adsorção de N_2 , estão apresentados na Tabela 4.9. Nesta tabela estão listados os valores das

áreas superficiais (A), volume de poros (V) e tamanho de poros (S) calculados por diferentes métodos das amostras de sílica modificadas com diferentes concentrações de GPTMS.

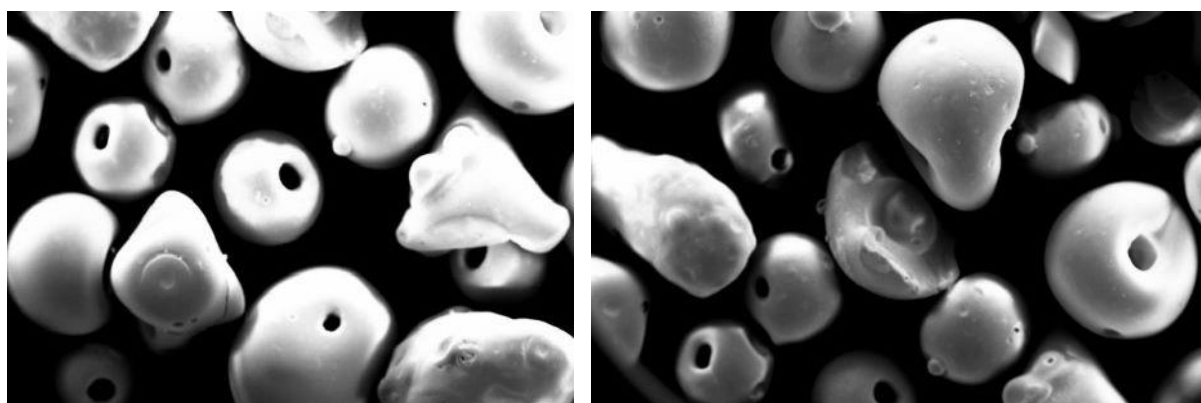
Tabela 4.9 – Resultados de adsorção de N₂ das amostras de sílica modificadas com diferentes concentrações de GPTMS.

% GPTMS na amostra	A (m ² g ⁻¹)	V (cm ³ g ⁻¹)	S (Å)
	S _{BET}	V _{Total}	D _{BET}
0	43,82	0,58	530,60
0,5	42,47	0,59	558,50
1,0	42,13	0,55	522,77
10,0	39,38	0,54	547,03

A introdução de grupos orgânicos conduz a uma diminuição da área específica, volume de poro e diâmetro de poro, indicando o ancoramento de espécies orgânicas na superfície da sílica (VALLET-REGI *et al.*, 2004; SONG *et al.*, 2005; YANG *et al.*, 2005).

De acordo com a Tabela 4.9, tal fato pode ser observado para a sílica modificada com concentração de 1,0 % de GPTMS.

A análise de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) mostrou que a modificação química na sílica tornou a distribuição do tamanho dos poros mais estreita, mas sem afetar o tamanho médio da cavidade (Figura 4.9).



a

b

Figura 4.9 - Características da sílica macroporosa, análise de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV): (a) antes e (b) depois ser submetida à silanização.

4.10 Hidrólise da Lactose em Reator Batelada

Pode-se observar, na Figura 4.10, as reações de hidrólise da lactose utilizando a enzima solúvel e a enzima imobilizada sem glutaraldeído foram mais lentas e alcançaram conversões menores do que a reação utilizando o biocatalisador preparado com a reticulação com glutaraldeído (86,0 % para enzima solúvel, 90,4 % para biocatalisador sem reticulação e 98,6 % para o biocatalisador com reticulação).

Na Figura 4.11 tem-se a curva de hidrólise da lactose para o biocatalisador imobilizado com reação de reticulação pós-imobilização. Após 5 h de reação, obteve-se 98,6 % de conversão.

Os resultados encontrados apresentam-se satisfatórios em relação aos encontrados na literatura. Xuemei *et al.*, (2007) estudaram a hidrólise da lactose presente no leite por β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* imobilizada em tecido de algodão e ligação cruzada com glutaraldeído em batelada com reciclo, obtendo aproximadamente 95 % de conversão de lactose após 2 h de operação.

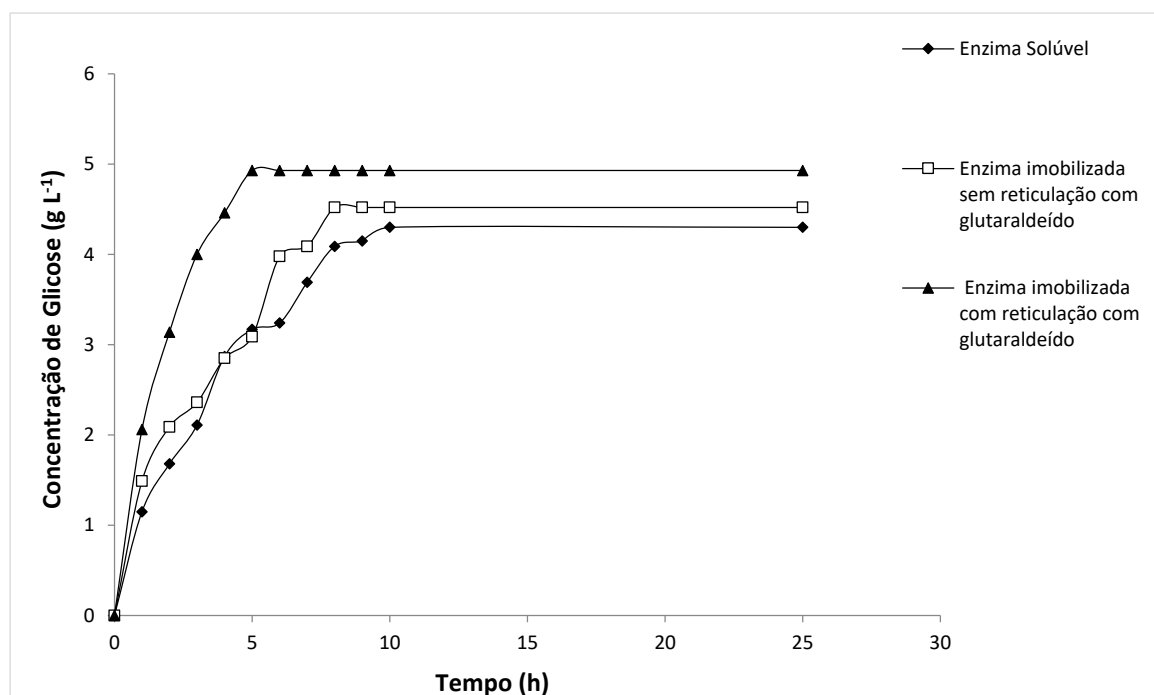


Figura 4.10 - Concentração de glicose durante a reação de hidrólise. Condições de reação: 40 °C, 0,5 % (m/v) de lactose em soro de leite, pH 6,5 e 50 U/g de lactose.

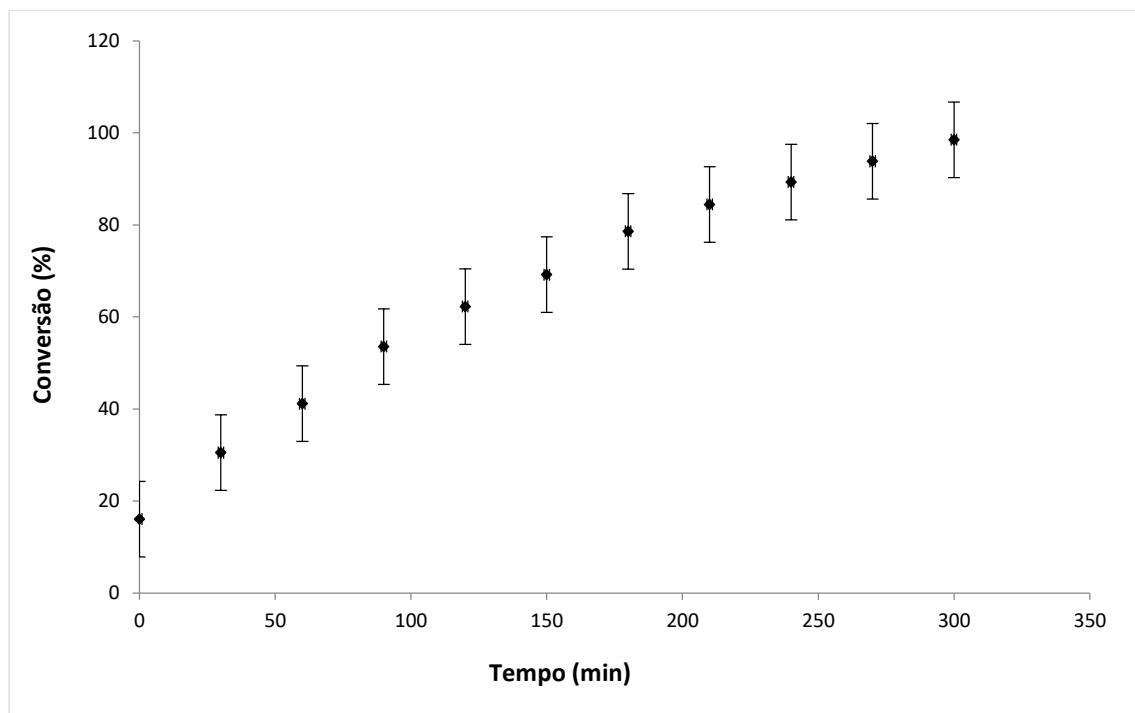


Figura 4.11 - Curva de conversão de lactose para o biocatalisador imobilizado com reticulação. Condições de reação: 40 °C, 0,5 % (m/v) de lactose em soro de leite, pH 6,5 e 50 U/g de lactose.

4.11 Estabilidade Operacional da Enzima β -Galactosidase Imobilizada

De acordo com as Figuras 4.12 e 4.13, o biocatalisador preparado sem a reação de reticulação teve uma perda de 71 % de sua atividade inicial após apenas quatro ciclos sucessivos. Já o biocatalisador preparado com a reação de reticulação pós-imobilização, teve uma perda de 43 % após o décimo ciclo.

Com base nesses resultados, foi possível verificar que, a enzima β -galactosidase de *Kluyveromices lactis* covalentemente imobilizada em sílica tem utilidade potencial para processar a lactose do leite no preparo de produtos com baixo teor de lactose. Embora a produção de biocatalisadores altamente ativos e estáveis por imobilização de β -galactosidase de várias fontes, incluindo *Kluyveromices lactis*, em suportes de glutaraldeído está muito bem documentada, o protocolo de preparação de sílica ativada utilizando baixa concentração de glutaraldeído (1,0 %, v / v), utilizado no presente trabalho, ainda é escasso na literatura. Vários trabalhos relatam a ativação de suportes em alta concentração do agente ativador (2,5 – 5,0 % v / v) para preparar suportes com alta densidade de grupos reativos (KLEIN *et al.*, 2012; PALAI e BHATTACHARYA, 2013). A concentração de glutaraldeído tem grande impacto na atividade e estabilidade de um biocatalisador. A concentração baixa de glutaraldeído permite

a preparação de biocatalisadores com recuperação de alta rigidez e alta estabilidade (ALONSO *et al.*, 2005). Além disso, o controle das condições durante a ativação do suporte com glutaraldeído possibilitou a modificação dos grupos amino do suporte com uma ou duas moléculas de glutaraldeído (alta concentração de glutaraldeído e longo tempo de reação). Esses suportes possuem reatividade diferente e permitem a preparação de biocatalisadores com estabilidades distintas (PALAI e BHATTACHARYA, 2013).

Portanto, a concentração de glutaraldeído durante a ativação de um suporte é uma variável importante para preparar um biocatalisador com propriedades úteis do ponto de vista industrial. As propriedades atividade/estabilidade, das enzimas imobilizadas sobre o suporte e posteriormente ativadas com glutaraldeído, dependem do emprego exato do protocolo de imobilização. Neste trabalho, obteve-se um biocatalisador altamente ativo e estável por fixação covalente em sílica macroporosa previamente ativada em baixa concentração de glutaraldeído em vez de excesso do ativador. Nas condições utilizadas neste trabalho, pode-se supor que uma molécula de glutaraldeído foi introduzida por grupo amino primário da sílica. Assim, a produção de biocatalisadores robustos a partir da imobilização da enzima β -galactosidase em suportes modificados com glutaraldeído a baixa concentração, é atraente economicamente em escala industrial.

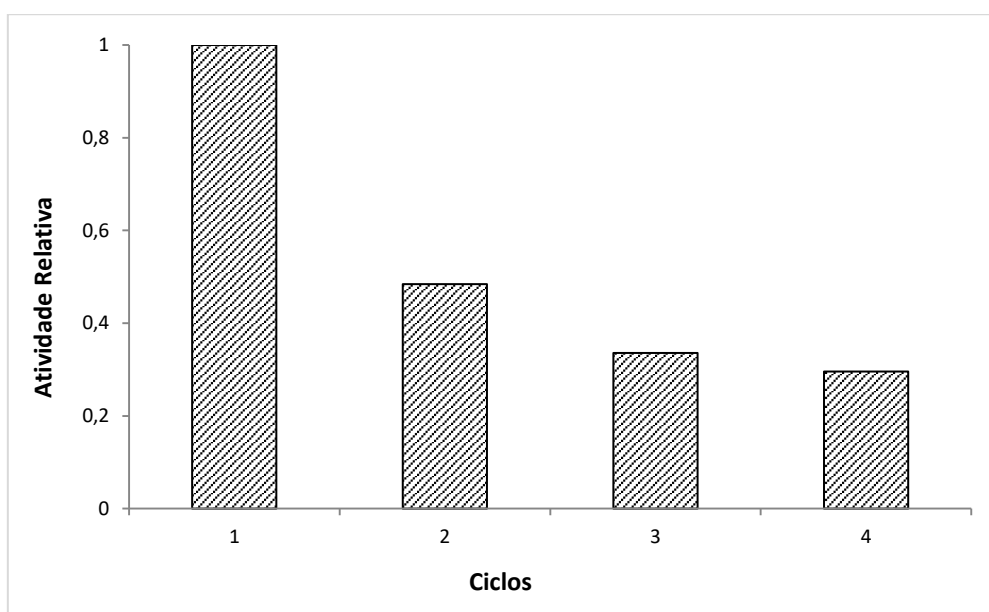


Figura 4.12 - Estabilidade operacional da enzima β -galactosidase imobilizada pelo método covalente, sem reticulação. Condições de reação: 40 °C, 5 % (m/v) de lactose em soro de leite, pH 6,5 e 50 U/g de lactose.

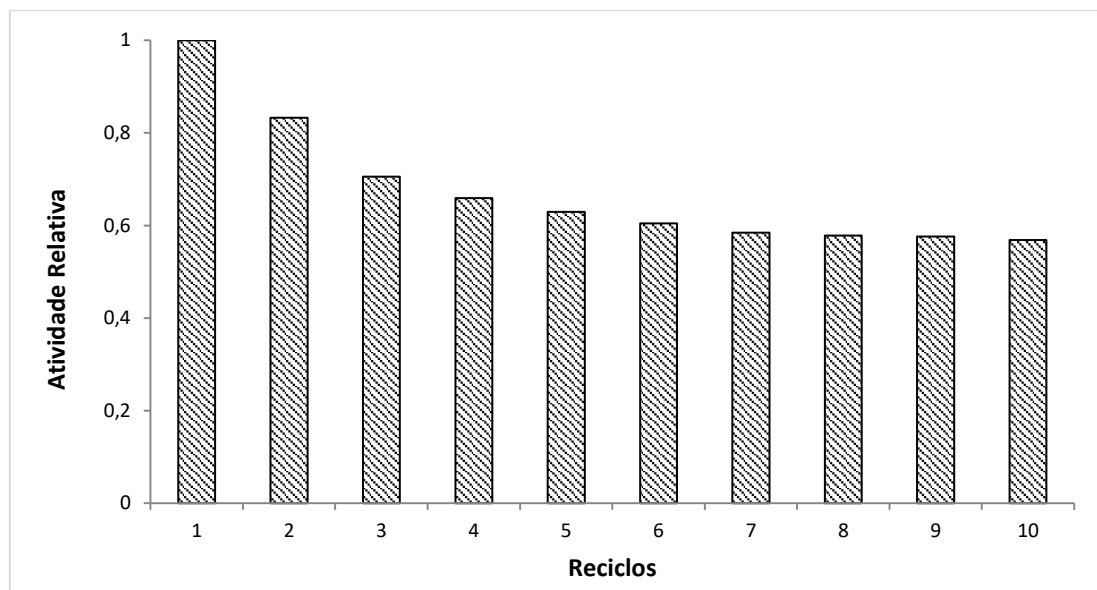


Figura 4.13 - Estabilidade operacional da enzima β -galactosidase imobilizada pelo método covalente, utilizando 1% de glutaraldeído na reticulação. Condições de reação: 40 °C, 5 % (m/v) de lactose em soro de leite, pH 6,5 e 50 U/g de lactose.

4.12 Síntese de Galacto-oligossacarídeos em Reator Batelada

4.12.1 Produção de Galacto-oligossacarídeos: Tampão de formulação Especial, Fosfato e Acetato

Testes preliminares foram realizados para determinar qual o melhor tampão para a realização da síntese. Foi escolhido o tampão especial (Tabela 3.2) pela sua semelhança com o leite de vaca. A Figura 4.14 mostra os resultados, indicando que no tampão fosfato houve predominância da reação de hidrólise em todo período da reação, da ordem de 139,53 g L⁻¹ de glicose e 116,00 g L⁻¹ de galactose, após 12 h de reação. O período de maior rendimento de GOS foi na primeira hora de reação. Neste período, a quantidade de GOS total (GOS1 + GOS2) foi de 56,06 g L⁻¹ enquanto a de glicose foi de 66,25 g L⁻¹ e a de galactose 58,23 g L⁻¹.

Na reação conduzida em presença de tampão acetato a maior produção de GOS foi obtida após 1 h de reação. A produção de GOS total, glicose e galactose foi da ordem de 13,55; 25,01 e 20,05 g L⁻¹, respectivamente. Isto sugere que a enzima pode ter sido desnaturada na presença desse tampão, ou os sais do tampão atuaram como inibidores da enzima.

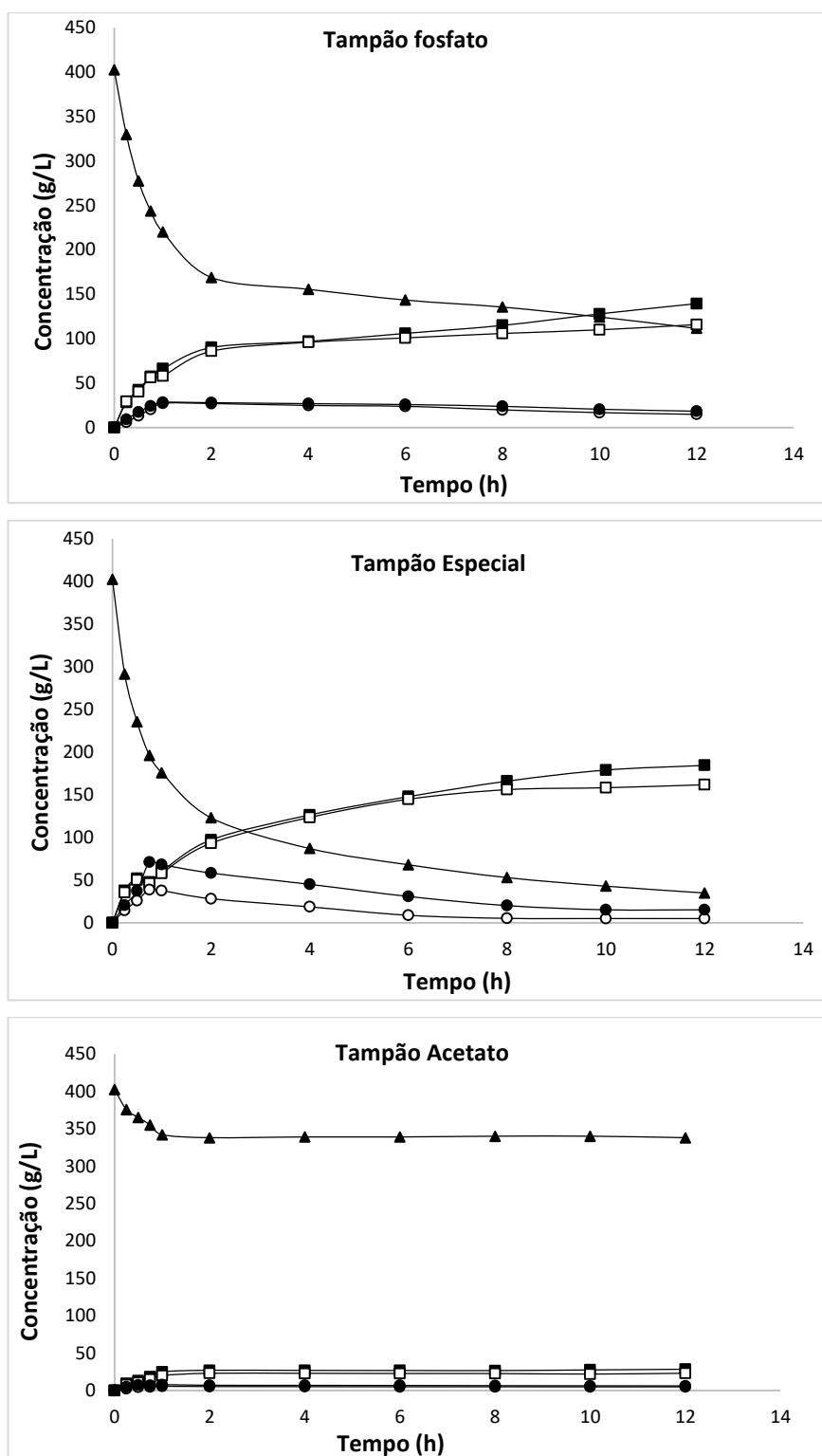


Figura 4.14 - Gráficos de produção de galacto-oligossacarídeos usando diferentes tipos de tampões, síntese em reator batelada: 40 °C, solução de 40 % (m/v) de lactose em soro de leite, pH 6,5 e 180 U/g de lactose. (▲) Lactose, (■) glicose, (□) galactose, (○) GOS1 e (●) GOS2.

O tampão de formulação especial foi o que apresentou maior concentração de GOS. A maior produção de GOS foi obtida após 45 min de reação, obtendo-se 110,21 g L⁻¹ de GOS total, 47,68 g L⁻¹ de glicose e 46,24 g L⁻¹ de galactose. Assim, as demais reações foram todas realizadas neste tampão.

4.12.2 Produção de Galacto-oligossacarídeos: 90, 180 e 240 U/g de lactose

Com o propósito de avaliar o efeito da concentração de β -galactosidase na síntese de GOS foram testadas várias concentrações da enzima imobilizada, como apresentado na Figura 4.15. Com a menor concentração de enzima (90 U/g de lactose) ocorreu baixa produção de GOS e maior tendência à reação de hidrólise. No final da reação, a produção de GOS total foi da ordem de 6,91 g/L enquanto a de glicose e galactose foi de 157,26 e 141,25 g L⁻¹, respectivamente. O período que mais produziu GOS foi na quarta hora de reação, da ordem de 7,46 g L⁻¹.

Na concentração mais elevada (240 U/g de lactose), o maior rendimento e GOS total encontra-se em 0,5 h de reação, da ordem de 104,44 g L⁻¹. Em seguida, houve uma diminuição da produção de GOS e aumento da reação de hidrólise. Ao final da reação, a produção de GOS total foi da ordem de 8,16 g L⁻¹, enquanto a de glicose e galactose foi de 180,53 e 157,25 g L⁻¹, respectivamente.

A reação enzimática com 180 U/g de lactose resultou no melhor rendimento de GOS total, 110,21 g L⁻¹, em 0,75 h de reação. Após esse período, a produção de GOS diminuiu de forma gradativa e aumentou a hidrólise. No final da reação a produção de GOS total foi da ordem de 110,21 g L⁻¹, enquanto a de glicose e galactose foi de 184,41 e 161,76 g L⁻¹, respectivamente.

Observando a Figura 4.17 da conversão de lactose, pode-se verificar que a velocidade da reação com maior quantidade de enzima é mais rápida nas duas primeiras horas de reação. A produtividade de 234,02 g L⁻¹ h⁻¹ em 0,25 h de reação enquanto na reação com 90 U/g de lactose é da ordem de 141,99 g L⁻¹ h⁻¹. Mas ao final da reação, a reação com 90 U/g de lactose atinge para a conversão de lactose 91,30 % e para a produtividade 1,69 g L⁻¹ h⁻¹, enquanto a de 240 U/g de lactose atinge 86,33 % e 0,68 g L⁻¹ h⁻¹, de conversão de lactose e produtividade, respectivamente.

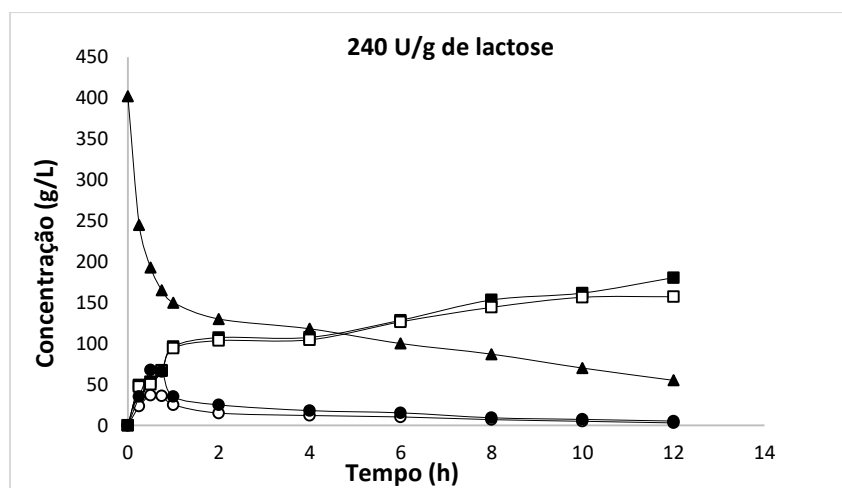
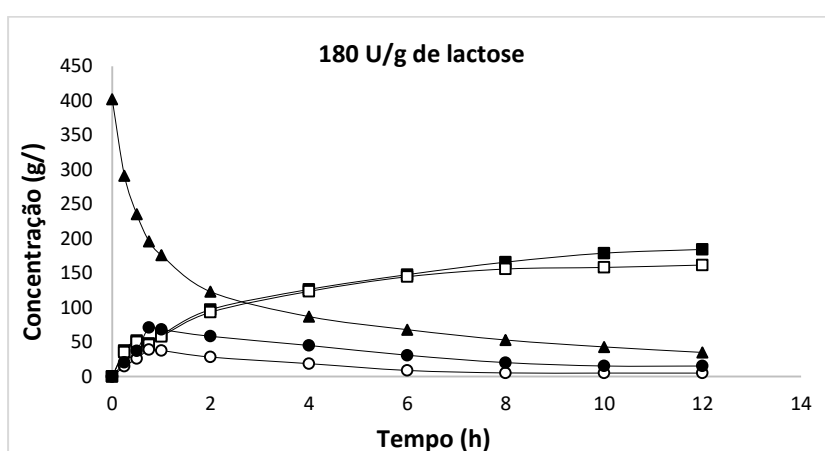
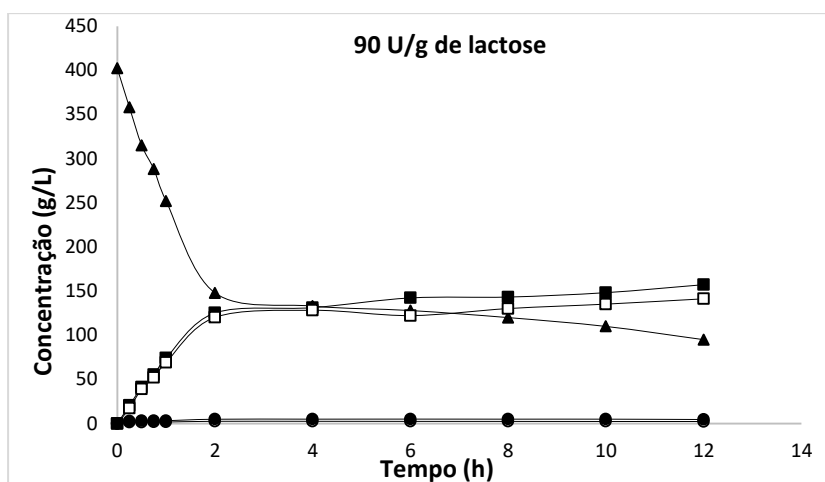


Figura 4.15 - Gráficos de produção de galacto-oligossacarídeos utilizando diferentes concentrações de biocatalisador imobilizado, síntese em reator batelada: 40 °C, 40 % (m/v) de lactose em soro de leite, tampão de formulação especial e pH 6,5. (▲) Lactose, (■) glicose, (□) galactose, (○) GOS1 e (●) GOS2.

Aumentando-se a quantidade de β -galactosidase, de 180 para 240 U/g de lactose, não houve melhora no rendimento total de GOS, conversão de lactose e produtividade (Figuras 4.16 e 4.17), como também observado na literatura. Chockchaisawasdee, *et al.*, (2005) observaram que o aumento da concentração da enzima não é proporcional ao aumento da síntese de oligossacarídeos, e que a limitação da produção não está relacionada apenas com a concentração da enzima, mas com outros parâmetros da reação, principalmente a concentração de lactose.

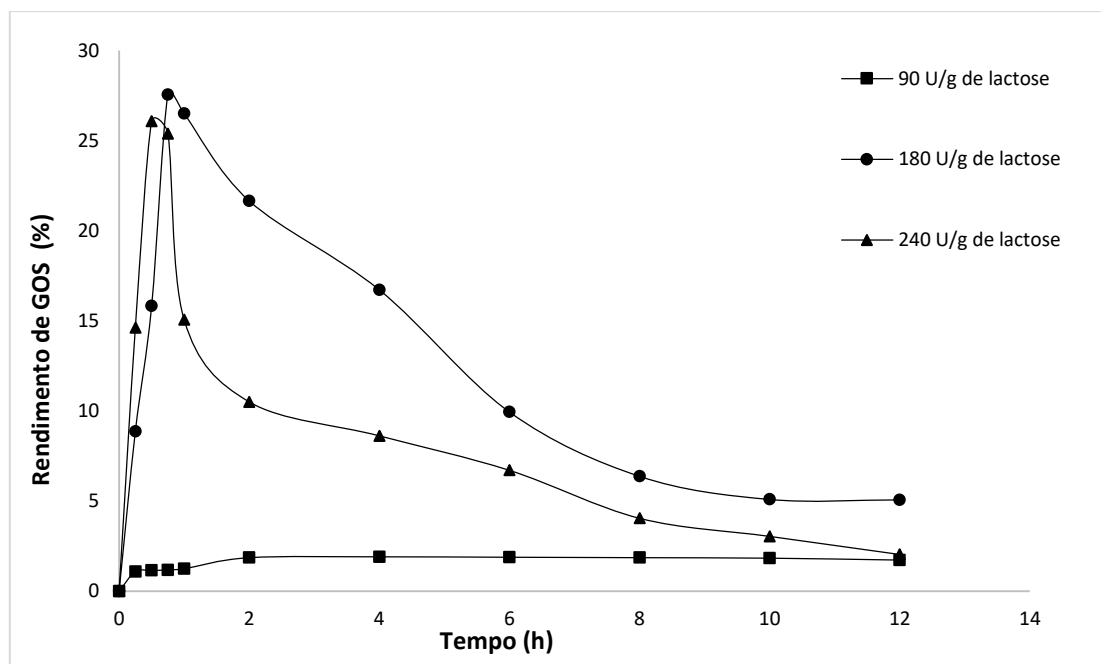


Figura 4.16 - Gráfico de rendimento de GOS em função do tempo utilizando diferentes concentrações de biocatalisador imobilizado, síntese em reator batelada: 40 °C, 40 % (m/v) de lactose em soro de leite, tampão de formulação especial e pH 6,5.

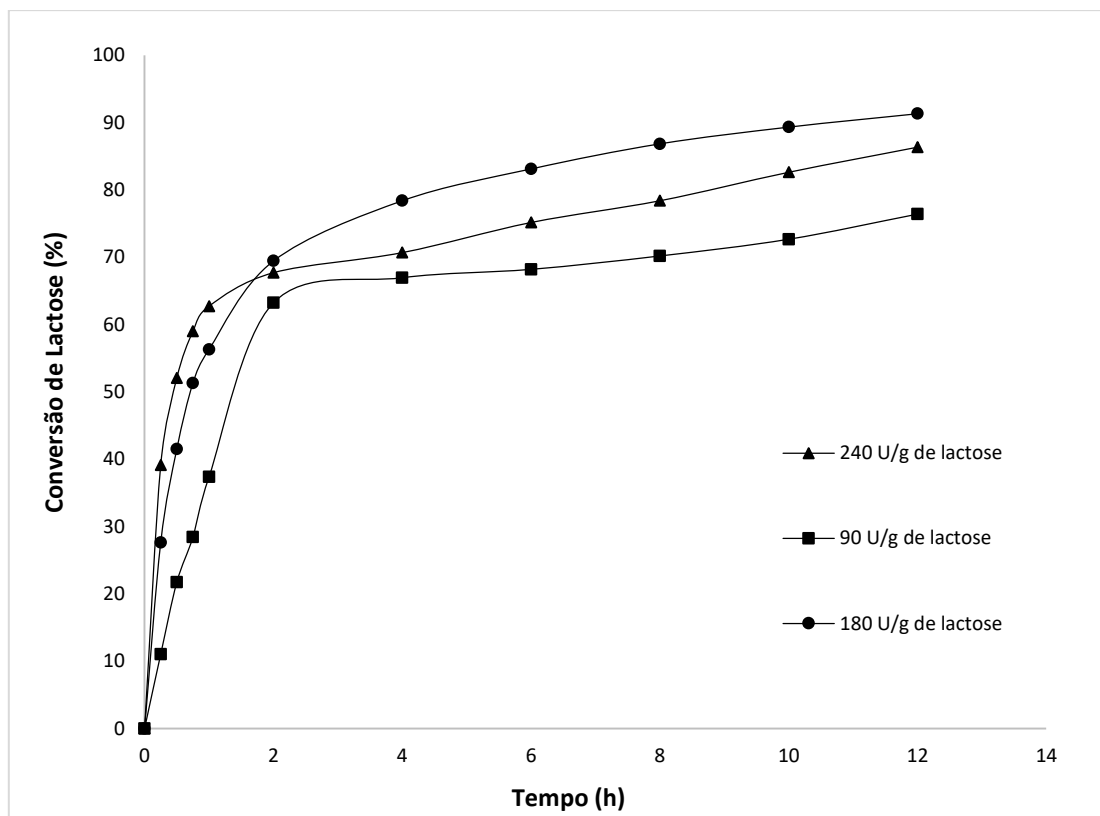


Figura 4.17 - Gráfico de conversão de lactose em função do tempo utilizando diferentes concentrações de biocatalisador imobilizado, síntese em reator batelada: 40 °C, 40 % (m/v) de lactose em soro de leite, tampão de formulação especial e pH 6,5.

4.12.3 Produção de Galacto-oligossacarídeos (40, 45 e 50°C)

Normalmente a temperatura tem um efeito significativo sobre as taxas de reação enzimática, porém mostrou não ter efeito sobre o rendimento total de GOS. As Figuras 4.18 e 4.19 apresentadas a seguir, mostram que a elevação de temperatura de 40 °C para 50 °C, diminuiu a concentração final de galacto-oligossacarídeos e dos outros produtos formados.

Para a temperatura de 40 °C a conversão de lactose atingida durante 12 h de reação, foi de 91,30 %, a 45 °C este valor cai para 78,93 % e a 50 °C para 64,70 %. Estes valores indicam que, embora a preparação enzimática obtida tenha grande estabilidade térmica, o aumento na temperatura, para uma reação de longo tempo, promoveu a desnaturação da enzima. O rendimento total de GOS e a produtividade também foram reduzidos com o incremento da temperatura.

Os dados obtidos estão de acordo com Lisboa *et al.*, (2012), no qual o aumento da temperatura apresentou um efeito negativo sobre a concentração de GOS, o rendimento, a concentração de lactose e a razão GOS/E. De acordo com os autores, tal efeito deu-se,

possivelmente, pela perda da atividade enzimática da β -galactosidase usada no estudo (*Kluyveromyces lactis*), devido à sua exposição por um longo período a uma temperatura maior.

Estes resultados também estão de acordo com os dados obtidos no item 4.6, em que a 45 °C e após 12 h, a enzima imobilizada e reticulada com 1,0 % de glutaraldeído, perdeu aproximadamente 20 % de sua atividade inicial, quando incubada na presença de solução de lactose a 5 % (m/v) em soro de leite.

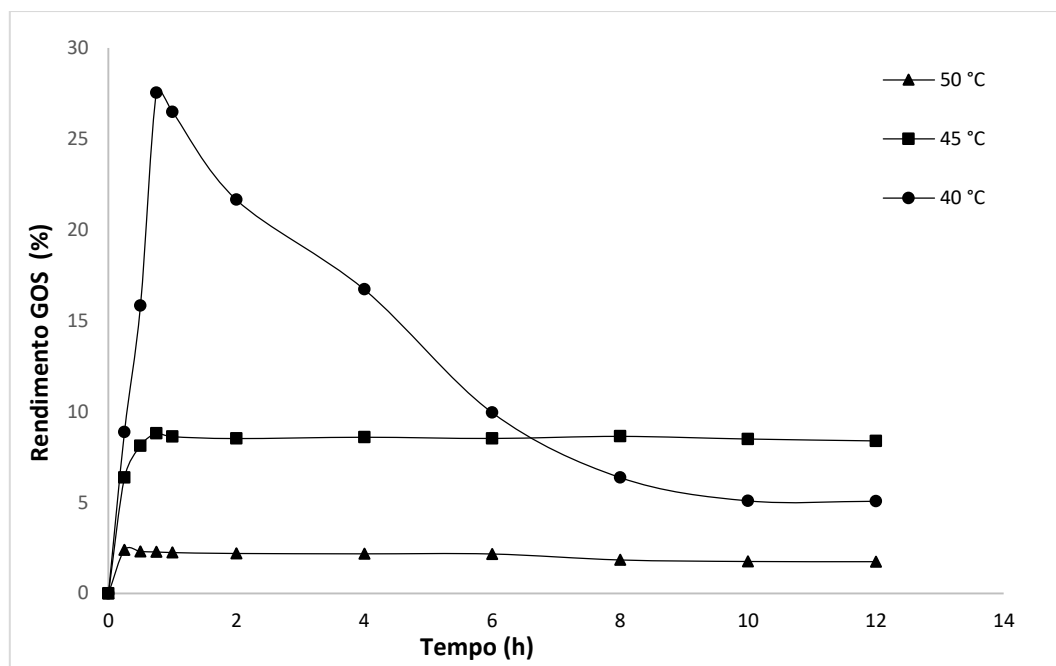


Figura 4.18 - Gráfico de rendimento de GOS em função do tempo para as diferentes temperaturas utilizadas, síntese em reator batelada: 40 % (m/v) de lactose em soro de leite, tampão de formulação especial, pH 6,5 e 180 U/g de lactose.

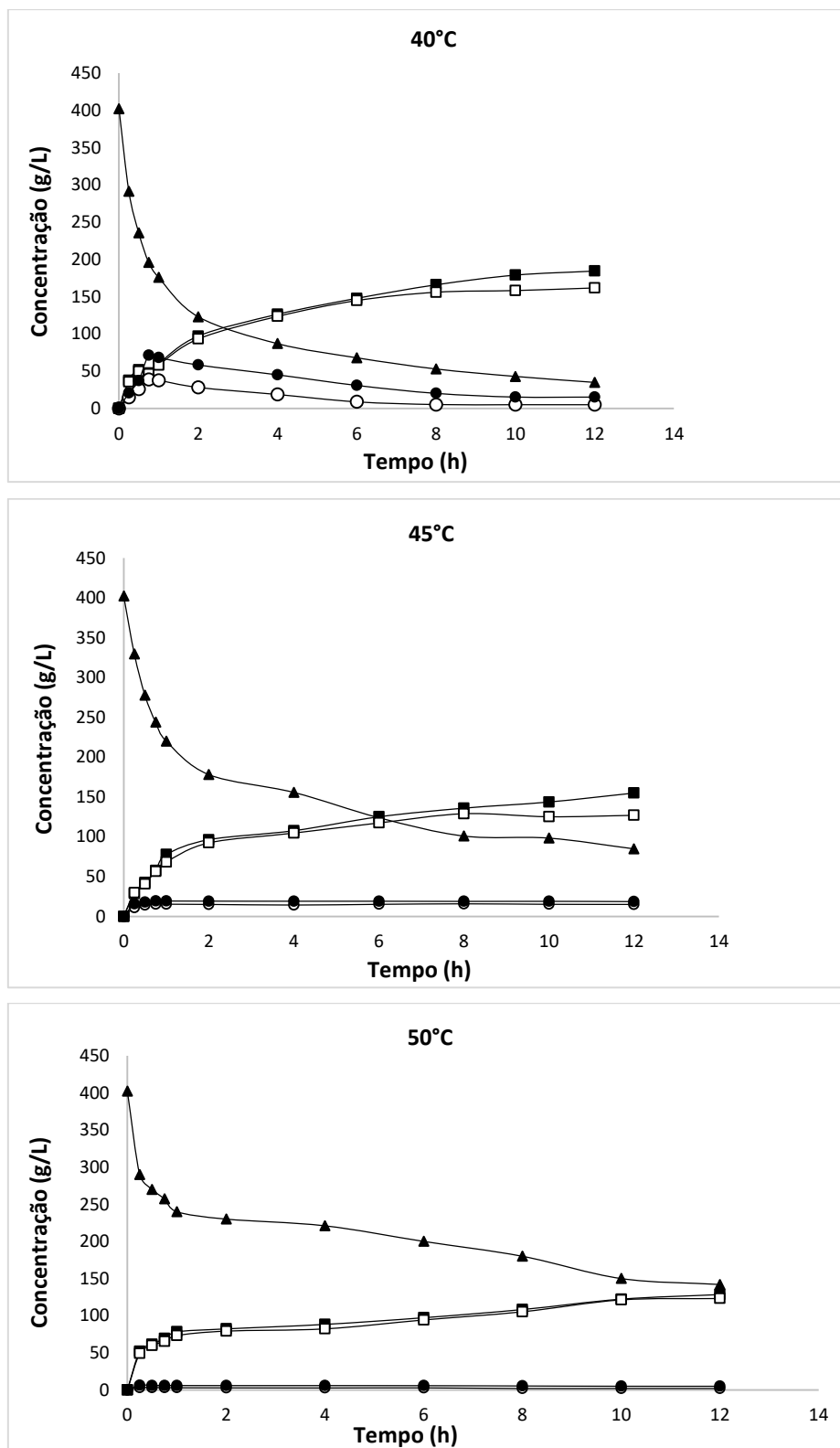


Figura 4.19 - Gráficos de produção de galacto-oligosacarídeos utilizando diferentes temperaturas, síntese em reator batelada: 40 % (m/v) de lactose em soro de leite, tampão de formulação especial, pH 6,5 e 180 U/g de lactose. (▲) Lactose, (■) glicose, (□) galactose, (○) GOS1 e (●) GOS2.

4.12.4 Produção de Galacto-oligossacarídeos: 30, 40 e 50 % de lactose

A Figura 4.20 apresenta os perfis cinéticos dos ensaios da síntese enzimática de GOS, a partir de solução de 30, 40 e 50 % m/v de lactose em soro de leite, respectivamente, indicando o consumo de lactose e a produção de glicose, galactose e galacto-oligossacarídeos.

A reação de transgalactosilação foi realizada até 12 horas. Observa-se pelas Figuras que, no tempo inicial de reação não há glicose, galactose e galacto-oligossacarídeos, havendo somente lactose presente no soro.

Observa-se na Figura 4.20 que, à medida que a concentração de lactose do soro diminui, ocorre um aumento na produção de glicose e galactose com o tempo, contudo a concentração de galactose é menor que a concentração de glicose, pois a maior parte dos galacto-oligossacarídeos é formada por duas moléculas de galactose e apenas uma de glicose (LISBOA *et al.*, 2012).

Tomal *et al.* (2010) concluíram que altas concentrações de lactose favorecem a reação de transgalactosilação, enquanto baixas concentrações de lactose favorecem a hidrólise da lactose. Assim, tornam-se válidos os picos de galacto-oligossacarídeos (GOS) formados no início da reação (até 45 min aproximadamente), pois primeiramente ocorre a reação de transgalactosilação, com a formação dos galacto-oligossacarídeos devido à alta concentração de lactose e, posteriormente, com a diminuição da lactose, ocorre uma diminuição da produção dos galacto-oligossacarídeos e aumento da concentração de glicose e galactose, devido à reação de hidrólise, que é favorecida com a redução da lactose durante a reação (Figura 4.20).

A maior concentração de GOS foi de 110,21 g L⁻¹, com rendimento máximo de 27,54 %, obtendo 46,24 g L⁻¹ de galactose, 47,68 g L⁻¹ de glicose, 196,00 g L⁻¹ de lactose e conversão de lactose igual a 51,28 %, determinada nas condições de 40 % de lactose, 40 °C, pH 6,5 e 180 U g⁻¹, após 0,75 hora de reação (Figura 4.21).

Sanz Valero (2009) trabalhando com β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* obteve 31 % de rendimento de GOS, em 40 % de lactose, 50 °C e pH 6,5. Sun *et al.*, (2016) trabalhando com a mesma enzima, obteve 35 % rendimento de GOS, em 35 % de lactose, 40 °C e pH 8,0. Martínez-Villaluenga *et al.*, (2008) obteve 14,05 % de rendimento GOS em 25 % de lactose, 50 °C e pH 6,5. Chockchaisawasdee *et al.* (2005), trabalhando com β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis*, obtiveram 99 g L⁻¹ de GOS em 40 % de lactose, 5,8 U mL⁻¹ de enzima, 40 °C, pH 7,0 em 4 horas de reação.

No presente trabalho, os resultados obtidos são coerentes com os encontrados na literatura. A conversão máxima de lactose em soro de leite que foi de 91,30 % ocorreu no ensaio a 40 % de lactose, 180 U g⁻¹ e lactose, 40 °C e 50 mg de proteína, no tempo de 12h. Neste período, o rendimento de GOS foi de 5,07 %, indicando que a hidrólise é favorecida em soluções com menores concentrações de lactose (TOMAL *et al.*, 2010). O rendimento máximo de GOS igual a 27,54 % foi obtido a 40 °C, 50 mg de proteína e 40 % de lactose. A produtividade foi máxima em 0,75 h igual a 141,98 g L⁻¹ h⁻¹ no ensaio a 40 % de lactose, 40 °C e 50 mg de proteína, sofrendo contínua redução ao longo da reação. Esse comportamento ocorre devido à inibição da glicose e galactose na formação dos galacto-oligosacarídeos a partir da lactose, conforme proposto por Rustom *et al.*, (1998). Alguns estudos mostraram resultados semelhantes, indicando produção máxima de GOS no início da reação, devido à atividade de transgalactosilação, enquanto a conversão de lactose aumenta ao longo da reação devido à atividade hidrolítica que é favorecida a baixas concentrações de lactose.

Desta forma, esperava-se que na reação em 50 % de lactose obtivesse os melhores resultados. Mas como pode-se ver no gráfico, esta reação teve comportamento semelhante à reação utilizando 30 % de lactose, predominância da hidrólise. Tal fato pode ser explicado pela baixa solubilidade da lactose, que é de aproximadamente 33,5 g de lactose por 100 g de água a 40 °C (WALSTRA *et al.*, 2006). Soluções de lactose supersaturadas podem ser facilmente obtidas, entretanto soluções com concentração 2,1 vezes a concentração de saturação são muito instáveis e a lactose precipita espontaneamente (WALSTRA *et al.*, 2006). Vera *et al.*, (2012) conduziram a síntese de GOS com uma solução inicial de lactose de concentração 2,1 vezes maior que a concentração de saturação, na qual a lactose foi parcialmente dissolvida no meio de reação. Sob essas condições, a produtividade específica e o rendimento de GOS diminuíram significativamente, já que a concentração de lactose solúvel diminuiu para um nível bem abaixo da saturação (entre 80 e 90 %) durante a maior parte do tempo da reação. Portanto, 2.1 vezes a concentração de lactose pode ser considerado um limite superior para a síntese de GOS, o que equivaleria neste trabalho a 48,24 % de lactose, justificando nossos resultados.

A solubilidade é fortemente dependente da temperatura. Desta forma, aumentando a temperatura, tal efeito poderia ser reduzido. Entretanto, em altas temperaturas, a baixa estabilidade da enzima produz efeitos negativos nos seus parâmetros cinéticos (Vera *et al.*, 2012). Este fato foi confirmado neste trabalho no item em que se estudou a estabilidade térmica da enzima (item 4.6) e a estabilidade operacional (4.11), indicando que conduzir a reação em temperaturas superiores a 45 °C não seria o mais indicado.

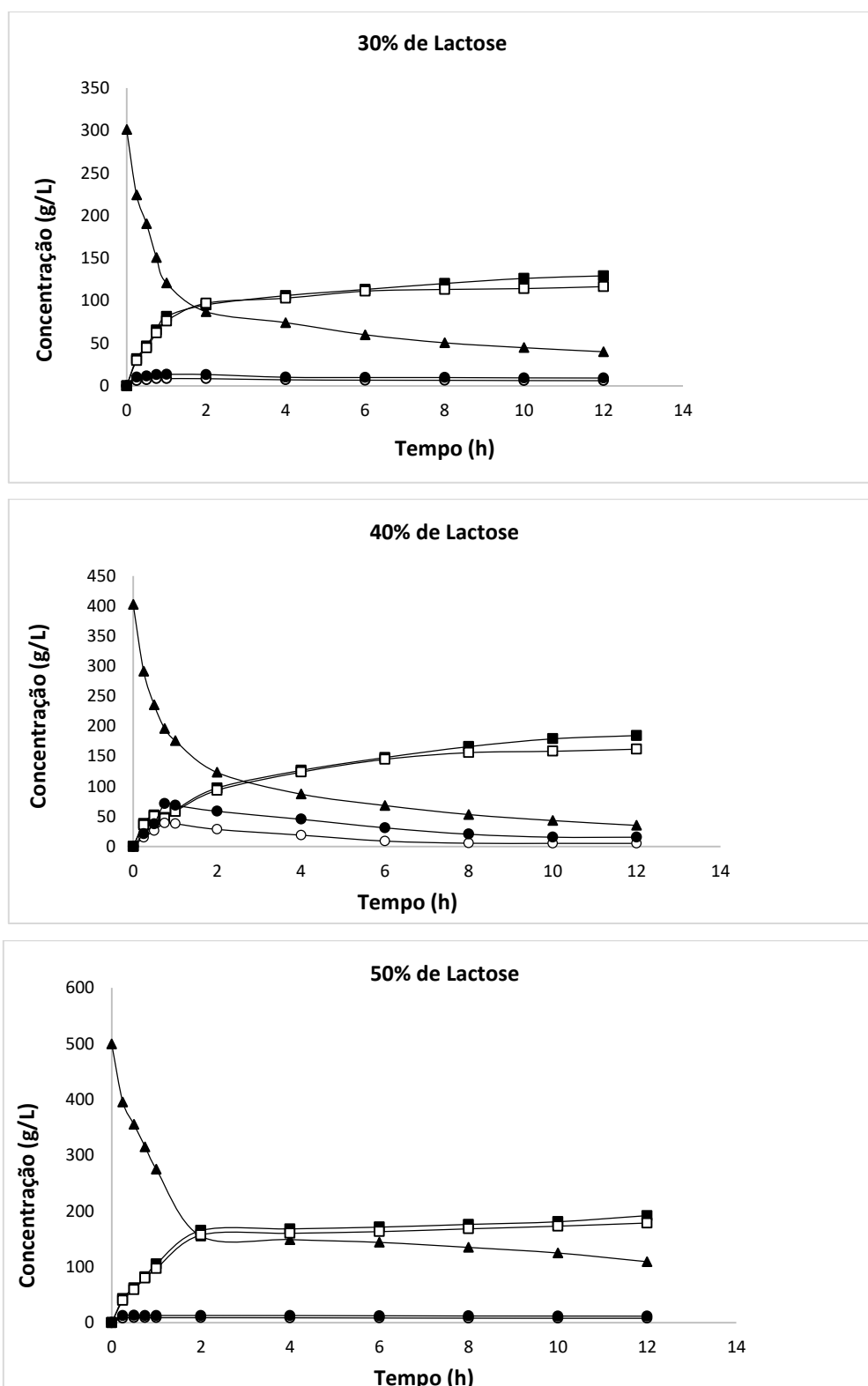


Figura 4.20 - Gráficos de produção de galacto-oligosacarídeos utilizando diferentes concentrações de lactose em soro de leite e tampão de formulação especial (pH 6,5), síntese em reator batelada: 40 °C, 180 U/g e pH 6,5. (▲) Lactose, (■) glicose, (□) galactose, (○) GOS1 e (●) GOS2.

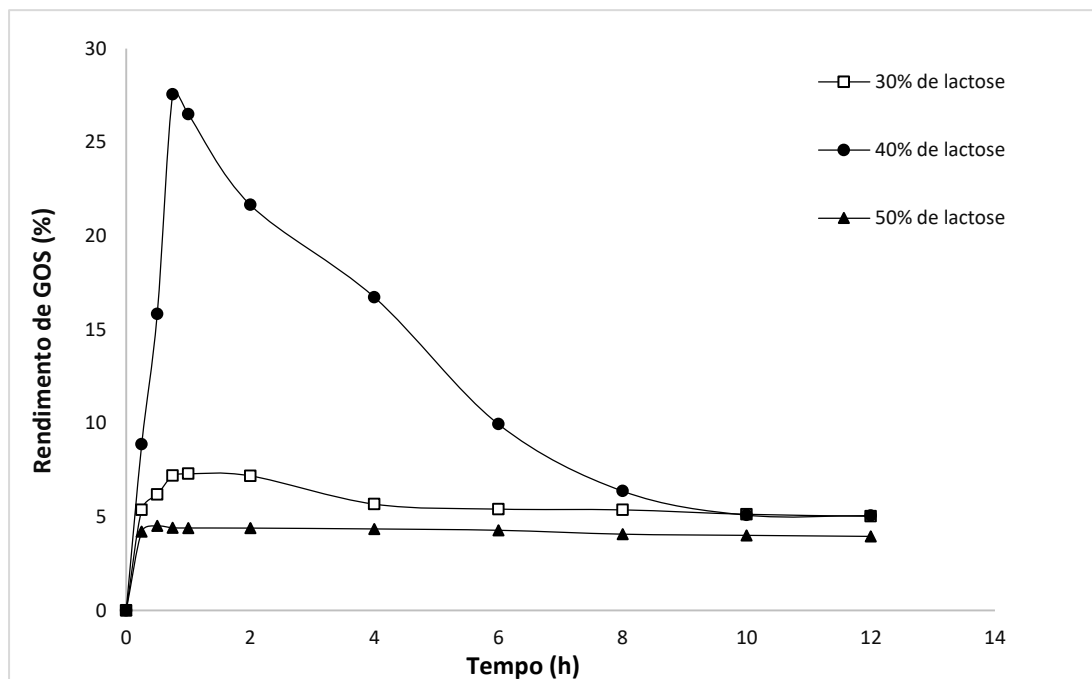


Figura 4.21 - Gráfico de rendimento de GOS em função do tempo para as diferentes concentrações de lactose em soro de leite e tampão especial (pH 6,5), síntese em reator batelada: 40 °C, 180 U/g.

4.13 Síntese de Galacto-oligossacarídeos em Reator Batelada Alimentada

Conforme descrito no item 3.2.12.2, a síntese de GOS em reator batelada alimentada foi realizada em três estágios. No primeiro estágio de 45 min, operou-se no regime batelada. No segundo estágio de 2,25 h, operou-se no modo batelada alimentada. E no último estágio de 3 h, operou-se no modo batelada novamente. Os resultados encontram-se nas Figuras 4.22 e 4.23.

O reator foi operado de modo batelada por 45 min até que o máximo de GOS fosse obtidos, conforme comprovado nos itens anteriores (Figura 4.21). Neste estágio, a concentração de GOS obtido foi de $111,25 \text{ g L}^{-1}$, com rendimento máximo de 27,81 %, $44,54 \text{ g L}^{-1}$ de galactose, $46,05 \text{ g L}^{-1}$ de glicose e $198,26 \text{ g L}^{-1}$ de lactose residual.

Conforme era adicionada lactose ao meio, no modo batelada alimentada, a concentração de GOS aumenta e a hidrólise diminui. Na última meia hora de reação, operando deste modo, a concentração de lactose começa a diminuir, pois os níveis de transgalactosilação e hidrólise estão aumentando. Neste estágio, a concentração de total dos GOS produzidos foi de $343,59 \text{ g L}^{-1}$, com rendimento máximo de 46,46 %, obtendo $86,00 \text{ g L}^{-1}$ de galactose, $88,00 \text{ g L}^{-1}$ de glicose, $221,95 \text{ g L}^{-1}$ de lactose residual. Neste estágio, a

alimentação de lactose, apresentou um incremento de 18,65 % em relação ao rendimento máximo obtido no primeiro estágio (45 min).

No terceiro estágio, a adição de lactose foi cessada e o reator operou de modo batelada. Pelos gráficos obtidos, pode-se observar que neste momento a reação de hidrólise aumenta até praticamente a segunda hora desta batelada e na última hora de reação as reações de hidrólise e transgalactosilação tendem a entrar em equilíbrio. Neste estágio a concentração total de GOS obtidos foi de 353,04 g L⁻¹, com rendimento máximo de 47,74 %, obtendo 140,01 g L⁻¹ de galactose, 143,26 g L⁻¹ de glicose, 103,26 g L⁻¹ de lactose residual. Neste estágio, a alimentação de lactose, apresentou um incremento de 19,93% em relação ao rendimento máximo obtido no primeiro estágio (45 min). Vera *et al.*, (2014) em seu estudo, utilizando um sistema de três estágios com batelada alimentada, obtiveram aumento de 14,28 % no rendimento de GOS o que demonstra que os resultados obtidos foram viáveis para uso da batelada alimentada.

Um fato interessante do efeito da alimentação de lactose foi o aumento da concentração de galacto-oligossacarídeos com maior grau de polimerização (GOS2). Para a reação batelada do primeiro estágio, a composição de GOS foi: 34,00 % de GOS1 e 65,99 % de GOS2, enquanto no final do segundo estágio a composição foi: 28, 57 % de GOS1 e 71, 43 % de GOS2. Ao voltar a operar do modo batelada, estágio 3, a concentração de GOS1 volta a aumentar e a composição ao final desse estágio foi: 48,09 % de GOS1 e 51,91 % de GOS2.

Os galacto-oligossacarídeos com maior grau de polimerização apresentam maior efeito prebiótico. Portanto, quando for desejado que os GOS obtidos tenham essa característica, é interessante utilizar o reator batelada alimentada.

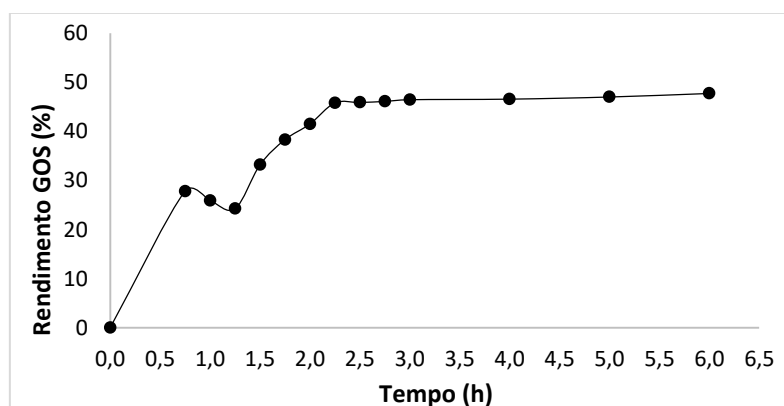


Figura 4.22 - Gráfico de rendimento de GOS em função do tempo, síntese em reator batelada alimentada: 40 °C, 40 % (m/v) de lactose em soro de leite, pH 6,5 e 180 U/g de lactose.

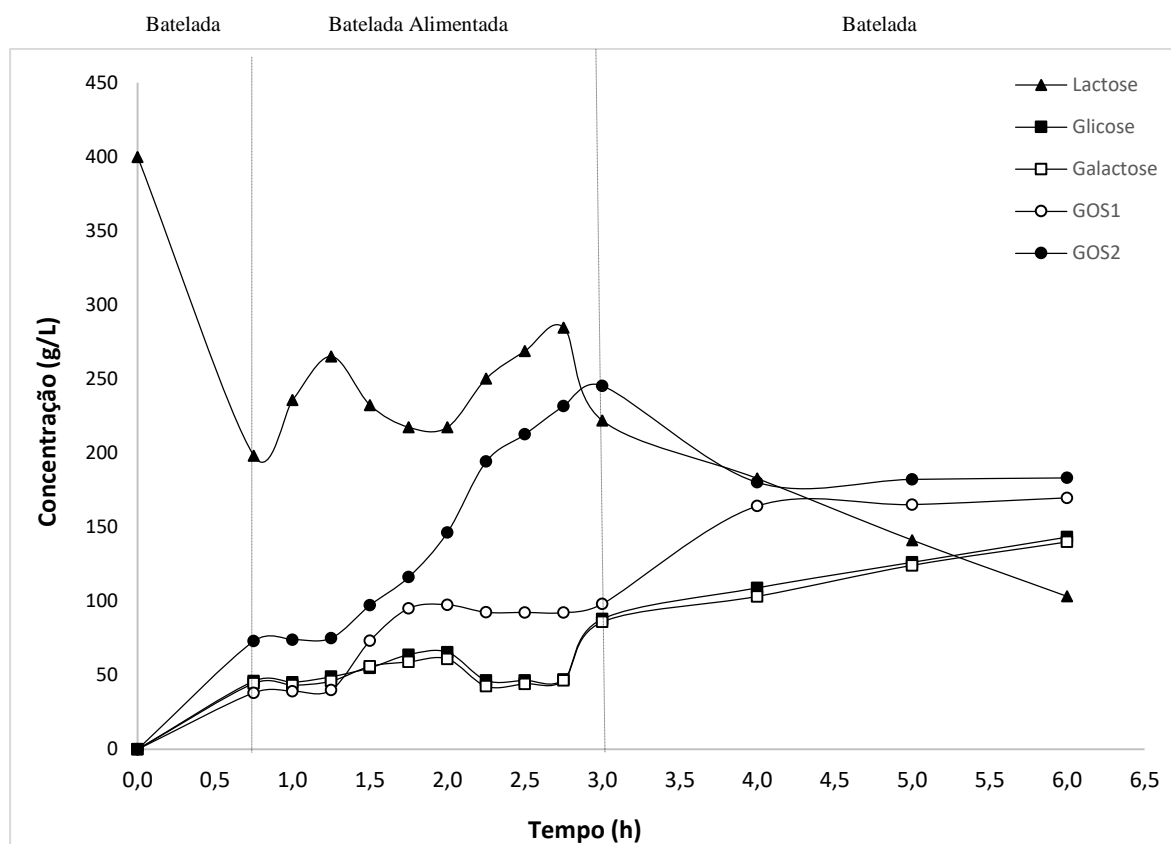


Figura 4.23 - Gráfico de produção de galacto-oligosacarídeos em reator batelada alimentada: 40 °C, 40 % (m/v) de lactose em soro de leite, pH 6,5 e 180 U/g de lactose. (▲) Lactose, (■) glicose, (□) galactose, (○) GOS1 e (●) GOS2.

4.14 Síntese de Galacto-oligosacarídeos em Reator Contínuo (CSTR)

Vera *et al.*, (2011) avaliaram o efeito da inibição da galactose na reação de transgalactosilação e concluíram que a enzima β -galactosidase é competitivamente inibida pela galactose mais severamente do que pela reação de hidrólise. Baseado nisso e nos estudos anteriores, foi realizada a síntese de GOS operando o reator de forma contínua. Dessa forma, a lactose estaria sendo continuamente alimentada e os produtos (lactose, glicose, galactose e GOS) estariam sendo retirados também, diminuindo reações competitivas.

Conforme descrito no item 3.2.12.3, a síntese de GOS em reator contínuo foi realizada em três estágios. No primeiro estágio de 45 min, operou-se no regime batelada. No segundo

estágio de 15,55 h, operou-se no modo contínuo. E no último estágio de 48 h, operou-se no modo batelada novamente.

A Figura 4.24 apresenta os perfis cinéticos da síntese dos açúcares em todo o processo. Pode-se observar que, no primeiro estágio, o reator foi operado de modo batelada por 45 min até que o máximo de GOS fosse obtido, conforme comprovado no item 4.12. Neste estágio a concentração total de GOS obtidos foi de 111,75 g L⁻¹, com rendimento máximo de 27,90 %, obtendo 44,25 g L⁻¹ de galactose, 46,26 g L⁻¹ de glicose, 198,25 g L⁻¹ de lactose residual, conforme mostrado na Figura 4.21.

Ao começar o processo contínuo (segundo estágio), há aumento da produção de GOS e queda na taxa de hidrólise, até o final deste estágio, no tempo de 16 h. Neste estágio, a concentração total de GOS (GOS1 + GOS2) obtidos foi de 302,62 g L⁻¹, com rendimento máximo de 57,70 %, obtendo 20,40 g L⁻¹ de galactose, 21,94 g L⁻¹ de glicose e 179,48 g L⁻¹ de lactose residual.

No terceiro estágio, nos primeiros 45 min (16,75 h) há aumento tanto da reação de transgalactosilação como da hidrólise e queda na concentração de lactose. Este é o ponto em que há o maior rendimento de GOS (Figura 4.24) de todo o processo. A concentração de GOS obtidos foi de 355,39 g L⁻¹, com rendimento máximo de 67,44 % (Figura 4.25), obtendo 25,18 g L⁻¹ de galactose, 26,73 g L⁻¹ de glicose, 119,90 g L⁻¹ de lactose. Neste estágio, o uso do processo contínuo apresentou um incremento de 39,54 % em relação ao rendimento máximo de GOS obtido no primeiro estágio (45 min) e 19,70 % em relação ao processo batelada alimentada.

Entre o período de 16,75 h até o período de 28 h, há uma queda na concentração de lactose, o que leva há uma diminuição na reação de transgalactosilação e aumento na reação de hidrólise. Após o período de 28 h até o final do último estágio (64 h), as reações de transgalactosilação e hidrólise entram em equilíbrio, assim como a concentração de lactose.

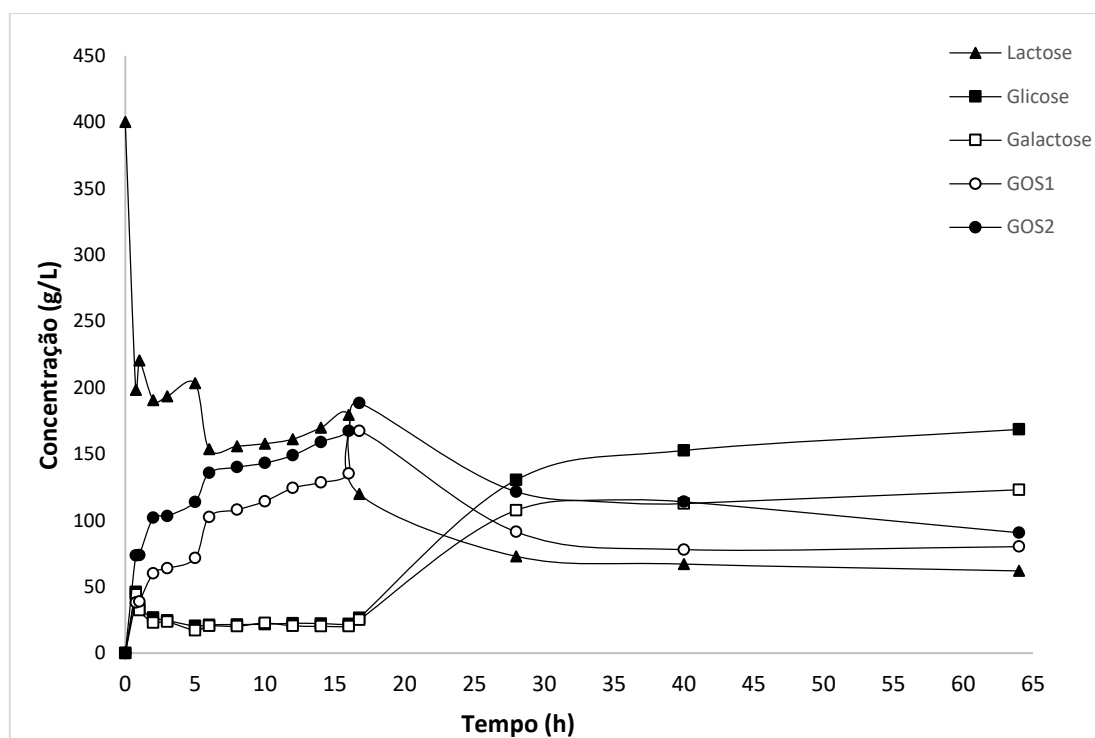


Figura 4.24 - Gráfico de produção de galacto-oligosacarídeos síntese em reator em contínuo: síntese a 40 °C, 40 % (m/v) de lactose em soro de leite, pH 6,5 e 180 U/g de lactose. (▲) Lactose, (■) glicose, (□) galactose, (○) GOS1 e (●) GOS2.

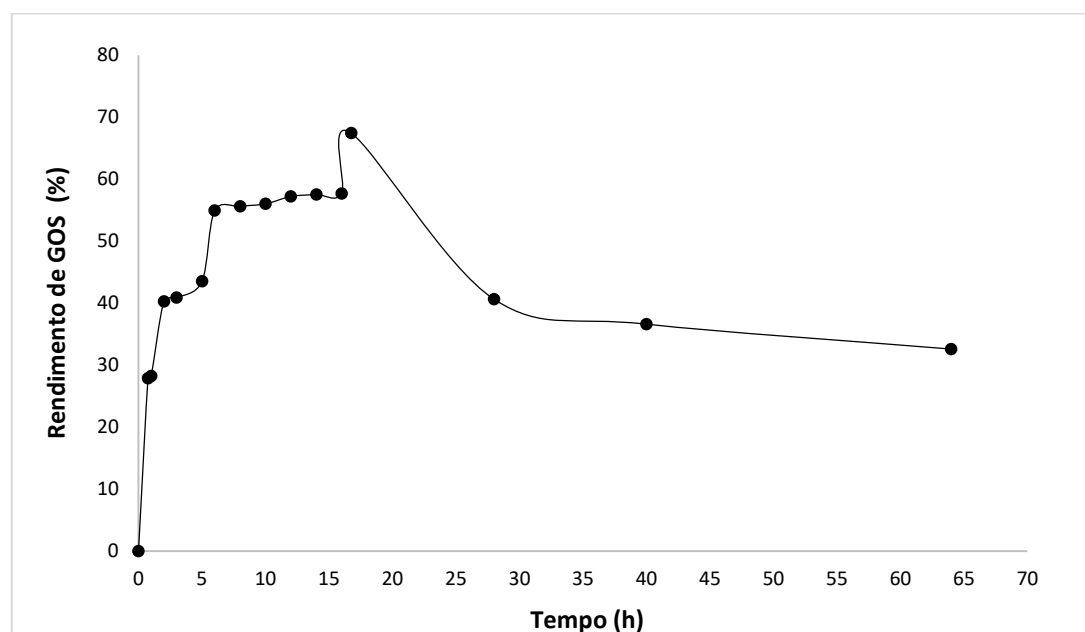


Figura 4.25 - Gráfico de rendimento de GOS em função do tempo para o processo contínuo: síntese em reator em contínuo: síntese a 40 °C, 40 % (m/v) de lactose em soro de leite, pH 6,5 e 180 U/g de lactose.

4.15 Considerações Finais

A enzima β -galactosidase imobilizada em glioxil sílica e reticulada com glutaraldeído mostrou-se um biocatalisador adequado para a produção de galacto-oligossacarídeos a partir de soro de leite. O processo no reator batelada teve alguns parâmetros otimizados: tipo do tampão, concentração do biocatalisador, temperatura e concentração de lactose no soro de leite. Este modo de operação de reator já mostrou um rendimento de GOS satisfatório em relação ao encontrado na maioria dos trabalhos da literatura, 27,54 %.

Visando melhorar ainda mais a produção de GOS, foram utilizados os reatores batelada alimentada e contínuo (CSTR), obtendo 46,46 e 57,70 % de rendimento de GOS, respectivamente. Vale a pena destacar que no reator batelada alimentada, apesar do rendimento ser menor que o obtido no reator contínuo, a produção de GOS com maior grau de polimerização foi maior, característica esta que é desejável quando se deseja GOS com maior efeito prebiótico.

Para melhorar ainda mais esses resultados, é interessante a realização de um planejamento experimental para cada tipo de reator.

5. CAPÍTULO V - CONCLUSÕES

O processo proposto – transgalactosilação a partir do soro de leite, catalisada por β -galactosidase imobilizada em sílica macroporosa – visando à obtenção de galacto-oligossacarídeos, mostrou-se eficiente. Para o reator batelada, a enzima apresentou rendimento de 27,54 % de GOS. No reator batelada alimentada, houve um aumento deste rendimento para 47,74 % e, no reator contínuo, alcançou 67,44 %.

As melhores condições para a síntese de GOS determinadas no processo batelada foram: tampão de formulação especial, 40 °C, 40 % de lactose (m/v) no soro, pH 6,5, 180 U g⁻¹ de lactose e 0,75 hora de reação. Nesta síntese a composição final de açúcares foi de 110,21 g/L de GOS, 46,24 g L⁻¹ de galactose, 47,68 g L⁻¹ de glicose, 196,00 g L⁻¹ de lactose e conversão de lactose igual a 51,28 %.

Nos ensaios de síntese, o tampão exerceu forte influência. O tampão de formulação especial foi o que apresentou maiores taxas de transgalactosilação em relação à hidrólise. O aumento da concentração da enzima não foi proporcional ao aumento da síntese de oligossacarídeos, comprovando que a limitação da produção não está relacionada apenas com a concentração da enzima.

Embora a preparação enzimática obtida tivesse grande estabilidade térmica, o aumento na temperatura, para uma reação de longo tempo, promoveu a desnaturação da enzima. Todos os outros parâmetros também foram reduzidos com o incremento da temperatura.

A concentração de lactose mostrou-se como um dos parâmetros mais importantes na síntese de GOS. Altas concentrações de lactose favorecem a reação de transgalactosilação, enquanto baixas concentrações de lactose favorecem a hidrólise da lactose. Porém, a síntese em reações supersaturadas de lactose torna-se inviável devido à baixa solubilidade deste açúcar. Por isso, foi utilizada em todas as sínteses posteriores, 40 % de lactose (m/v).

O rendimento máximo da operação no reator contínuo ocorre nos primeiros 45 min da terceira etapa (16,75 h). No período de 28 h inicia-se uma diminuição na taxa de transgalactosilação e aumento da hidrólise, até que estas reações entrem em equilíbrio. Para a operação em reator batelada alimentada, o rendimento máximo ocorre no final de todo o processo (6 h). No início do terceiro estágio do reator de batelada alimentada (processo batelada), as taxas de hidrólise e transgalactosilação entram em equilíbrio, mas sem diminuir a taxa de transgalactosilação. Esse fato ocorre porque na operação em modo contínuo, no terceiro estágio, a quantidade de lactose é menor do que no modo batelada alimentada. Assim, o terceiro estágio que ocorre no modo batelada, é interessante apenas por 45 min para

o modo contínuo e pode atingir até 3 h para o lote alimentado. Mesmo assim, o rendimento máximo do modo contínuo foi 1,41 vezes maior que o de batelada alimentada e 2,45 vezes maior que o batelada, o que torna este modo de operação mais atraente do ponto de vista da produção industrial.

As condições ótimas de imobilização e estabilização encontradas para β -galactosidase foram obtidas utilizando-se sílica macroporosa ativada com grupos glioxil (950 μeqv de grupos aldeídos/g de suporte) como suporte, 20 °C, pH 7,0, 48 horas de reação, redução com borohidreto de sódio, por 30 min, e posterior reticulação com glutaraldeído (1,0 %), por 30 min. Nessas condições, a enzima imobilizada reteve 147,00 % da atividade inicial e mostrou-se mais de vinte vezes mais estável que a enzima solúvel. Essa alta estabilidade do biocatalisador obtido resultou devido à alta rigidez da molécula de enzima imobilizada, promovida pela estabilização da estrutura dimérica da enzima. A maior estabilidade da enzima imobilizada foi verificada em pH de 6,5.

Os maiores valores de atividade da enzima imobilizada ocorreram em 45 °C, alcançando a atividade máxima igual a 1433 U g^{-1} suporte obtida em pH 6,5. A reticulação com glutaraldeído aumentou em torno de 16 % a atividade aparente do biocatalisador obtido. A imobilização e formação de grupos aldeídos foi confirmada pela quantificação dos grupos aldeídos formados e da análise da estrutura do suporte por análise BET.

As reações de hidrólise da lactose utilizando a enzima solúvel e a enzima imobilizada sem glutaraldeído foram mais lentas e alcançaram conversões em média 10 % menores do que a reação utilizando o biocatalisador preparado com a reticulação com glutaraldeído. Na análise de estabilidade operacional, o biocatalisador preparado sem a reação de reticulação perdeu sua atividade inicial após apenas quatro ciclos sucessivos. Já o biocatalisador preparado com a reação de reticulação pós-imobilização teve uma pequena perda após o segundo e terceiro ciclo, mas manteve a atividade constante até o décimo ciclo, demonstrando esta capacidade por mais alguns ciclos.

6. CAPÍTULO VI - SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- a) Testar enzimas com atividade β -galactosidase provenientes de outros micro-organismos.
- b) Avaliar a cinética dos processos batelada, batelada alimentada e contínuo.
- c) Otimizar os processos batelada alimentada e contínuo.
- d) Realizar planejamento experimental para os diversos processos envolvidos no trabalho: imobilização enzimática e produção de GOS nos diferentes tipos de reatores.
- e) Utilizar outras formas de reator para a produção de GOS, como leito fixo e leito fluidizado.
- f) Separar os produtos da reação de transgalactosilação e analisá-los, podendo fazer uma aplicação em algum produto lácteo para posteriores ensaios de análise sensorial.

7. CAPÍTULO VII - REFERÊNCIAS

ABIQ - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE QUEIJOS, 2019, “Pecuária de leite apresenta estagnação em 2018 após crescimento de 5% em 2017”. Disponível em: https://www.abiq.com.br/noticias_ler.asp?codigo=2178&codigo_categoria=6&codigo_subcategoria=6 Acesso: 22 de maio de 2019

AKIYAMA, K., TAKASE, M., HORIKOSHI, K., OKONOGI, S., 2001, “Production of galactooligosaccharides from lactose using a betaglucosidase from *Thermus sp Z-1*”, *Biosci Biotechnol Biochem*, v. 65, n. 2, p. 438-441.

ALANDER, M., MATTO, J., KNEIFEL, W., JOHANSSON, M., KOGLER, B., CRITTENDEN, R., MATTILA-SANDHOLM T., SAARELA, M., 2001, “Effect of galactooligosaccharide supplementation on human fecal microflora and on survival a persistence of *Bifidobacterium lactis* Bb-12 in the gastrointestinal tract”, *International Dairy Journal*, v. 11, p. 817- 825.

ALBAYRAK, N., YANG, S.T., 2002, “Production of galacto-oligosaccharides from lactose by *Aspergillus oryzae* β -galactosidase immobilized on cotton cloth”, *Biotechnology and Bioengineering*, v. 77, p. 9-18.

ALMEIDA, E., BONASSI, I.A., ROÇA, R.O., 2001 “Características físicas e químicas de bebidas lácteas fermentadas e preparadas com soro de queijo minas frescal”, *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 21, n. 2, p. 187-192.

ALMEIDA, K.E., TAMIME, A.Y., OLIVEIRA, M.N., 2009, “Influence of total solids content of milk whey on the acidifying profile and viability of various lactic acid bacteria”, *Food Science and Technology*, v. 42, p. 672-678.

ALMEIDA, M.M., 2003, *Síntese de galacto-oligosacarídeos por β -galactosidase de *Scopulariopsis sp* a partir da lactose*. Tese (Doutorado em Ciência em Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos - Universidade Estadual de Campinas.

ALMEIDA, M.M.; PASTORE, G.M., 2004, “Açúcares funcionais: Produção de galactooligosacarídeos por β -galactosidases utilizando metodologia de superfície de resposta”, *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, Brasília, v. 32, p. 10-14.

ALONSO, N., LÓPEZ-GALLEGO, F., BETANCOR, L., HIDALGO, A., MATEO, C., GUIBAN, J.M., 2005, “Immobilization and stabilization of glutaryl acylase on aminated sephabeads supports by the glutaraldehyde crosslinking method”, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 35, p. 57-61.

ÁLVAREZ-CAO, M.E., CERDÁN, M.E., GONZÁLEZ-SISO, M.I., BECERRA, M., 2019, "Bioconversion of Beet Molasses to Alpha-Galactosidase and Ethanol", *Front. Microbiol.*, v. 10, n. 405, p.1-15.

ALVES, M.P., MOREIRA, R.O., RODRÍGUES JUNIOR, P.H., MARTINS, C.F.F, PERRONE, I.T., CARVALHO, A.F., 2014, "Soro de leite: tecnologias para o processamento de coprodutos", *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, v. 69, n. 3, p. 212-226.

ANDRADE, R.L.P., MARTINS J.F.P., 2002, "Influência da adição da fécula de batata-doce sobre a viscosidade do permeado de soro de queijo", *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 22, n. 3.

ANSARI, S.A., HUSAIN, Q., 2012, "Lactose hydrolysis from milk/whey in batch and continuous process by concanavalin A-Celite 545 immobilized *Aspergillus oryzae* β -galactosidase", *Food and Bioproducts Processing*, v. 90, n. 2, p.351-359.

ANSARI, S.A., SATAR, R., ZAIDI, S.K., NASEER, M.I., KARIM, S., ALQAHTANI, M.H.; RASOOL, M., 2015, "Nanodiamonds as an effective and novel matrix for immobilizing β -galactosidase", *Food and Bioproducts Processing*, v. 95, p. 298-303.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada – RDC Nº. 256, DE 23 DE SETEMBRO DE 2016. *Diário Oficial da União*: 3 p. 2016. Disponível em: [http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2955920/Proposta+de+norma+em+dicuss%C3%A3o+\(CP+256\).pdf/cf24c873-ff1c-4215-8311-e1ae11f9772f](http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2955920/Proposta+de+norma+em+dicuss%C3%A3o+(CP+256).pdf/cf24c873-ff1c-4215-8311-e1ae11f9772f) Acesso: 22 de mai de 2019.

ARAUJO, Y.C., TOLEDO, P.G., LEON, V., GONZALEZ, H.Y., 1995, "Wettability of Silane-Treated Glass Slides as Determined from X-Ray Photoelectron Spectroscopy", *J. Colloid Interface Sci.*, v. 176, p. 485–490.

ARONSON, M., 1952, "Transgalctosylation during lactose hydrolysis", *Arch Biochem.*, v. 39(2), p. 370-378.

ARRIZON, J., MOREL, S., GSCHAEDLER, A., MONSAN, P., 2012, "Fructanase and fructosyltransferase activity of non-*Saccharomyces* yeasts isolated from fermenting musts of Mezcal", *Bioresource Technology*, v. 110, p. 560-565.

ARTYOMOVA, A.A., VOROSHILOVA, O.I., NIKITIN, Y.U.S., KHOKHLOVA, T.D., 1986, "Macroporous silica in chromathography and immobilization of biopolymers", *Advances in Colloid and Interface Science*, v. 25, p. 235-248.

ATES, S., MEHMETOGLU, Ü, 1997, "A new method for immobilization of β -galactosidase and its immobilization in a plug flow reactor", *Process Biochemistry*, v. 32, n. 5, p. 433-436.

BAGAL, D., KARVE, M.S., 2006, "Entrapment of plant invertase within novel composite of agarose-guar gum biopolymer membrane", *Analytica Chimica Acta*, v. 555, p. 316-321.

BAILEY, J.E., OLLIS, D.F., 1986, *Biochemical Engineering Fundamentals*, Second Edition, New York.

BAILEY, R.K., FILETI, C.P., KEITH, J., TROPEZ-SIMS, S., PRICE, W., ALLISON-OTTEY, S.D., 2013, "Lactose intolerance and health disparities among African Americans and Hispanic Americans: An updated consensus statement", *Journal of the National Medical Association*, v. 105, n. 2, p. 112-127.

BARRETEAU, H., DELATTRE, C., MICHAUD, P., 2006, "Production of oligosaccharides as promising new food additive generation", *Food Technology and Biotechnology*, v. 44, n. 3, p. 323-333.

BAUMAN, D.E., MATHER, I.H., WALL, R.J., LOCK, A.L., 2006, "Major advances associated with the biosynthesis of milk", *Journal of Dairy Science*, v. 89, n. 4, p. 1235-1243.

BEDNARSKI, W., KULIKOWSKA, A., 2007, "Influence of two-phase system composition on biocatalytic properties of β -galactosidase preparations", *Chem Pap.*, v. 61, p. 364-369.

BENEVIDES, I.A., VEIGAS, A., 2014, "Aspectos históricos, fisiológicos e antroposóficos do leite na alimentação humana: uma introdução ao tema", *Arte Méd Ampl.*, v. 34, n. 1, p. 5-12.

BERGER, J.L., LEE, B.H., LACROIX, C., 1995, "Immobilization of β -galactosidase from *Thermus Aquaticus* YT-1 for oligosaccharides synthesis", *Biotechnol Lett*, v. 9, p. 601-606.

BERNAL, C., SIERRA, L., MESA, M., 2014, "Design of β -galactosidase/silica biocatalysts: Impact of the enzyme properties and immobilization pathways on their catalytic performance", *Engineering in Life Sciences*, v. 14, p. 85-94.

BOBBIO, P. A., BOBBIO, F. O., 1992, *Introdução à Química de Alimentos*. São Paulo – SP. Livraria Varela.

BOON, M. A., JANSSEN, A. E. M., RIET, K. V., 2000, "Effect of temperature and enzyme origin on enzymatic synthesis of oligosaccharides", *Enzyme and Microbial Technology*, v. 26, p. 271-281.

BRADFORD, M.M., 1976, "A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding", *Analytical Biochemistry*, New York, v. 72, p. 248-254.

BRANDELLI, A., DAROIT, D.J., CORRÊA, A.P.F., 2015, "Whey as a source of peptides with remarkable biological activities", *Food Research International*, v. 73, p. 149-161.

BRANS, G.B.P.W., SCHROËN, C.G.P.H., SMAN, R.G.M., VAN DER BOOM, R.M., 2004, "Membrane fractionation of milk: state of the art and challenges", *Journal of Membrane Science*, v. 243, n. 2, p. 263- 272.

BRASIL, 2006, Ministério da Saúde. Resolução RDC nº205. Enzimas e Preparações Enzimáticas para Uso na Produção de Alimentos Destinados ao Consumo Humano. Diário Oficial da União, Brasília.

BRENA, B.M., GIACOMINI, C., IRAZOQUI, G., BATISTA-VIEIRA, F., 2001, "Influence of the immobilization chemistry on the properties of immobilized β -galactosidase", *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 11, p. 597-606.

BRUKE, C., 1984, Methods of Immobilizing Cells, In: WEBB, C., BLACK, G.M, ATKINSON, B. Process Engineering Aspects of Immobilized Cells Systems; Institution of Chemical Engineers-Northeastern Branch, England, p. 20-34.

BULCHHOLZ K., KASCHE V., BORNSCHEUER U. T., 2005. *Biocatalysts and Enzyme Technology*, 2ª ed, Wiley-VCH Verlag Gmbh & Co.KgaA: Weinheim.

CABRAL, J.M.S, KENNEDY, J.F., 1991, Covalent and coordination immobilization of proteins. In: Protein immobilization. Fundamentals and Applications (Taylor, R. F., ed.), Marcel Dekker, New York, p. 73-138.

CABRAL, J.M.S., AIRES-BARROS, M.R., GAMA, M., 2003, Engenharia Enzimática, Lidel, Lisboa.

CAMARGO, D.S., ALVES, G., GARCIA, S.,2000, "Bebida fermentada à base de soro de leite e isolado protéico de soja", *Semina*, v.21, p.45-51.

CAMPELLO, G. S., TRINDADE, R. A., RÉGO, T. V., BURKERT, J. F. M., BURKERT, C. A. V., 2012, "Immobilization of β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* on Eupergit® C and Properties of the Biocatalyst", *International Journal of Food Engineering*, v. 8, p. 1-17.

CANANI, R.B., PEZZELLA, V., AMOROSO, A., COZZOLINO, T., DI SCALA, C., PASSARIELLO, A., 2016, "Diagnosing and treating intolerance to carbohydrates in children", *Nutrients*, v. 8 n. 3, p. 157.

CANCINO-MADARIAGA, B., RUBY, R., ASTUDILLO CASTRO, C., SAAVEDRA TORRICO, J. AND LUTZ RIQUELME, M., 2012, "Analysis of the membrane fouling mechanisms involved in clarified grape juice ultrafiltration using statistical tools", *Industrial & Engineering Chemistry Research*, v. 51, p. 4017-4024.

CAO L., 2005, "Immobilized enzymes: science or art?", *Current Opinion in Chemical Biology*, v.9, p. 217-226.

CARDELLE-COBAS, A., CORZO, N., OLANO, A., PELÁEZ, C., REQUENA, T., ÁVILLA, M., 2011, "Galactooligosaccharides derived from lactose and lactulose: Influence of structure on *Lactobacillus*, *Streptococcus* and *Bifidobacterium* growth", *International Journal of Food Microbiology*, v. 149, p. 81-87.

CARVALHO, J.C.M, SATO, S., 2001, "Fermentação Descontínua", *Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica*, v. 2, p. 193-204.

CASABLANCA, F.G., SANTÍN, J.L., 1998, *Ingeniería Bioquímica*. 1ª edition. Editora Sintsis.

CAVILLE, D., COMBES, D., 1995, "Characterization of β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*", *Apply Biochemistry*, v. 22, p. 55-64.

CHEETHMAN, P.S.J., 1985, *Principles of industrial enzymology basis of utilization of soluble and immobilized enzymes in industrial process*. In: WISEMAN, A. ed., *Handbook of enzyme biotechnology*, 2nd ed., Chichester, John Wiley & Sons.

CHEN, S. X., WEI, D. Z., HU, Z. H., 2001, "Synthesis of galacto-oligosaccharides in AOT/isooctane reverse micelles by β -galactosidase", *J Mol Catal B Enzym*, v.16, p.109-14.

CHEN, X.Y., GÄNZLE, M.G., 2017, "Lactose and lactose-derived oligosaccharides: More than prebiotics?", *International Dairy Journal*, v. 67, p. 61–72.

CHIBATA I., 1978, "Immobilized Enzymes – research and development", New York: John Wiley & Sons, p. 108-147.

CHIBATA I., TOSA T., SATO T., MORI T., MATSUO Y., 1972, "Preparation and industrial application of immobilized aminoacyclases", *Fermentation Technology Today*, p. 383-389.

CHO Y.J., SHIN. H.J., BUCKE, C., 2003, "Purification and biochemical properties of a galactooligosaccharide producing β -galactosidase from *Bullera singularis*", *Biotechnol Lett*, v. 25, p. 2107-2111.

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

CHOI, J.M.; HAN, S.S.; KIM, H.S., 2015, "Industrial applications of enzyme biocatalysis: current status and future aspects", *Biotechnology Advances*, v. 33, n. 7, p. 1443–1454.

CIPOLATTI, E.P., SILVA, M.J.A., KLEIN, M., FEDDERN, V., FEITES, M.M.C., OLIVEIRA, J.V., NIVOW, J.L., OLIVEIRA, D., 2014, "Current status and trends in enzymatic nanoimmobilization", *J. Mol. Catal. B. Enzym.*, v. 99, p. 56-67.

CÓRDOVA, A., ASTUDILLO, C., VERA, C., GUERRERO, C., ILLANES, A., 2016, "Performance of an ultrafiltration membrane bioreactor (UFMBR) as a processing strategy for the synthesis of galactooligosaccharides at high substrate concentrations", *J Biotechnol*, v. 223, p. 26–35.

CORGNEAU, M; SHER, J.; RITIÉ-PERTUSA, L.I.E, D.T.L.; PETIT, J.; NIKOLOVA, Y.; BANON, S.; GAIANI, C., 2015, "Recent advances on lactose intolerance: tolerance thresholds and currently available solutions", *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 57, n. 15.

CORZO-MARTINEZ, M., LUSCHER, A., DE LAS RIVAS, B., MUÑOZ, R., MORENO, F.M., 2015, "Valorization of cheese and tofu whey through enzymatic synthesis of lactosucrose", *PLoS ONE*, v. 10, n. 9.

COULIER, L., TIMMERMANS, J., BAS, R., VAN DEN DOOL, R., HAAKSMAN, I., KLARENBECK SLAGHEK, T.; VAN DONGEN, W., 2009, "In-depth characterization of prebiotic galacto oligosaccharides by a combination of analytical techniques", *J. Agric. Food Chem.*, v. 57, p. 8488–8495.

CRITTENDEN, R. G., MORRIS, L.F., HARVEY, M.L., TRAN, L.T., PLAYNE, M.J., 2001, "Selection of a *Bifi dobacterium* strain to complement resistant starch in a synbiotic yoghurt. *J. Appl. Microbiol.*, v. 90, n. 2, p. 268-278, 2001.

CRITTENDEN, R. G., PLAYNE, M. J., 1996, "Production, properties and applications of food grade oligosaccharides", *Trends in Food Science & Technology*, v. 7, n. 11, p. 353–361.

- CUMMINGS, J. H., 1981, "Short chain fatty acids in the human colon", *Gut*, v. 22, p. 763-779.
- DATTA, S., CHRISTENA, L.R., RAJARAM, Y.R.S., 2013, "Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials", *3 Biotechnology*, v. 3, p. 1-9.
- DAVID, A.E., WANG, N.S., YANG, V.C., YANG, A.J., 2006, "Chemically surface modified gel (CSMG): An excellent enzyme-immobilization matrix for industrial process", *Journal of Biotechnology*, v. 125, p. 395-407.
- DAVIES, G.J., CHARNOCK, S.J., HENRISSAT, B., 2001, "The enzymatic synthesis of glycosidic bonds: "Glycosynthases" and Glycosyltransferases", *Trends in Glycoscience and Glycotechnology*, v. 13, n. 7, p. 105-120.
- DE VRESE, M., STEGELMAN, A., RICHTER, B., FENSELAU, S., LAUE, C., SCHREZENMEIER, J., 2001, "Probiotics-compensation for lactase insufficiency". *American Journal of Clinical Nutrition*, v. 73, p. 421-429.
- DE VRESE, M.; LAUE, C.; OFFICK, B.; SOETH, E.; REPENNING, F.; THOB, A.; SCHREZENMEIER, J.A., 2015, "A combination of acid lactase from *Aspergillus oryzae* and yogurt bacteria improves lactose digestion in lactose malabsorbers synergistically: A randomized, controlled, double-blind cross-over trial", *Clinical Nutrition*, v. 34, p. 394-399.
- DELZENNE, N.M., ROBERFROID, M.R., 1994 "Physiological effects of nondigestible oligosaccharides", *LebWissen Technol*, v. 27, p. 1-6.
- DEWAN, S.S., 2017, Global Markets for Enzymes in Industrial Applications. Disponível em: <https://www.bccresearch.com/market-research/biotechnology/enzymesindustrialapplications-report-bio030j.html> Acesso em: 21 de março de 2019.
- DI SERIO, M., MATURA, C., DE ALTERIS, E., PARASCANDOLA, P., TESSER, R., SANTACESARIA, E., 2003, "Lactose hydrolysis by immobilized β -galactosidase: the effect of the supports and the kinetics", *Catalysis Today*, v. 79-80, p. 333-339.
- DIXON, M., WEBB, E.C., 1979, *Ezymes*. 3rd ed., London, Longman Group Limited.
- DONG, Y., SUN, Y., CHEN, Y., WU, W., 2015, "Determination of lactose solubility in organic-aqueous biphasic system", *J Chinese Inst Food Sci Technol*, v. 15, p. 262-267.
- DRASAR, B.S.; JENKIS, D.J.A.; CUMMINGS, J.H., 1976, "Influence of a diet rich in wheat fiber on human fecal flora", *Journal of Medical Microbiology*, v. 9, p. 423-431.

DSM. *Maxilact for lactose free dairy product*, 2018. Disponível em: <https://www.dsm.com/markets/food-specialties/en/products/dairy/maxilact.html>. Acesso em: 01 de junho 2019.

DULLIUS, A., GOETTERT, M.I., DE SOUZA, C.F.V., 2018, "Whey protein hydrolysates as a source of bioactive peptides for functional foods—Biotechnological facilitation of industrial scale-up", *Journal of Functional Foods*, v. 42, p. 58-74.

EBRAHIMI, M., PLACIDO, L., ENGEL, L., SHAMS ASHAGHI, K., CZERMAK, P., 2010, "A novel ceramic membrane reactor system for the continuous Enzymatic synthesis of oligosaccharides", *Desalination*, v. 250, p. 1105–1108

EL SHAFEI, G.M.S., 2000, *Silica surface chemical properties in Adsorption on silica surfaces*. Eugène Papier (ed.), Marcell Dekker: New York, 35-62.

ELNASHAR, M.M.M., YASSIN, M.A., 2009, "Lactose hydrolysis by β -galactosidase covalently immobilized to thermally stable biopolymers", *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 159, p. 426-437.

EMBRAPA, 2018, *ANUÁRIO leite 2018: Indicadores, tendências e oportunidades para quem vive no setor leiteiro*. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1094149/anuario-leite-2018-indicadores-tendencias-e-oportunidades-para-quem-vive-no-setor-leiteiro> Acesso: 21 de março de 2019.

EMBREGUL, E., SUNGUR, S., AKBULUT, U., 2006, "Polyacrylamide-gelatine carrier system used for invertase immobilization", *Food Chemistry*, v. 97, p. 591-597.

EQUATE, 2013, *Equate dairy digestive supplement*. Disponível em: <https://equatedairydigestivehttps://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1094149/anuario-leite-2018-indicadores-tendencias-e-oportunidades-para-quem-vive-no-setor-leiteiro> zq.wordpress.com/2013/07/ Acesso em: 01 de junho de 2019.

ERGINER, R., TOPPARE, L., ALKAN, S., BAKIR, U., 2000, "Immobilization of invertase in functionalized copolymer matrices", *Reactive & Functional Polymers*, v. 45, p. 227-233.

EUROFARMA, 2018, *Perlatte*. Disponível em: <https://www.eurofarma.com.br/wp-content/uploads/2016/10/perlatte-folheto.pdf>. Acesso em: 01 de junho de 2019.

FARIAS, R.F., AIROLDI, C., 2000, "Síntese e reatividade de sílica lamelar", *Química Nova*, v. 23, p. 88-93.

FENNEMA, O.R., SRINIVASAN D., KIRK, L.P., 2010, *Química de Alimentos de Fennema*. Tradução Adriano Brandelli (et al.). 4ª ed. Porto Alegre: Artmed, 900p.

FISCHER, C., KLEINSCHMIDT, T., 2018, "Synthesis of Galactooligosaccharides in Milk and Whey: A Review", *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*.

FOGLER, H.S., 2002, *Elementos de Engenharia das Reações Químicas*, Rio de Janeiro, LTC, 892p.

FONSECA, R.A.S., 2010, *Galactooligosacarídeos obtidos enzimaticamente no desenvolvimento de bebidas lácteas com potencial simbiótico*. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 161 p.

FOX, P. F., 1997, *Advanced Dairy Chemistry*. London: Chapman & Hall. 536p.

FOX, P. F., McSWEENEY, P.L.H., 1998, *Dairy Chemistry and Biochemistry*. London: Thomson Science, 478p.

FRENZEL, M., ZERGE, K., CLAWIN-RADECKER, I., LORENZEN, P.C., 2015, "Comparison of the galactooligosaccharide forming activity of different β -galactosidases", *LWT -Food Science and Technology*, v. 60, p. 1068-1071.

FRONDEL, C., 1962, "The system of mineralogy of DANA", New York: John Wiley & Sons.

GAJO, F.F.S., GAJO, A.A., SILVA, R.B.V., FERREIRA, E.B., 2016, "Diagnóstico da destinação do soro de leite na mesorregião do campo das vertentes - Minas Gerais", *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, v. 71, n.1, p. 26-37.

GALLINA, D.A., ANTUNES, A.E.C., AZAMBUJA-FERREIRA, N.C., MENDONÇA, J.B., NORBONA, R.A., 2012, "Caracterização de bebida obtida a partir de leite fermentado simbiótico adicionado de polpa de goiaba e avaliação da viabilidade das bifidobactérias", *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, v. 67, n. 386, p. 45-54.

GAMBELLI., L, 2017, "Milk and Its Sugar-Lactose: A Picture of Evaluation Methodologies", *Beverages*, v. 3, p. 35.

GASPARI, J.W., GOMES, L.H., TAVARES, F.C.A., 1999, "Imobilização da inulinase de *Kluyveromyces marxianus* para a hidrólise de extratos de *Helianthus tuberosus L.*", *Scientia Agrícola*, v. 56, p. 1135-1140.

GASPARIN, F. S. R., CARVALHO, J.M.T., ARAUJO, S.C., 2010, "Alergia à proteína do leite de vaca versus intolerância à lactose: as diferenças e semelhanças", *Revista Saúde e Pesquisa*, v. 3, n. 1, p. 107-114.

GAUR, R., PANT, H., JAIN, R., KHARE, S.K., 2006, "Galacto-oligosaccharide synthesis by immobilized *Aspergillus oryzae* b-galactosidase", *Food Chem*, v. 97, p. 426-430.

GEKAS, V., LOPEZ-LEIVA, M., 1985, "Hydrolysis of lactose – A literature review", *Process Biochemistry*, v. 20, p. 2-12.

GERNIGON, G., SCHUCK P., JEANTET, R., 2010, "Processing of mozzarella cheese wheys and stretchwaters: a preliminary review", *Dairy Science and Technology*, v. 90, n. 1, p. 27- 46.

GIACOMINI, C., VILLARINO, A., FRANCO-FRANGUAS, L., BATISTA-VIERA, F., 1998, "Immobilization of β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* on silica and agarose: comparison of different methods", *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v: 4, p. 313-327.

GIBSON, G.R., ROBERFROID, M.B., 1995, "Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics", *Journal of Nutrition*, v. 125, p. 1401-1412.

GIBSON, G.R.; PROBERT, H.M.; LOO, J.V.; RASTALL, R.A.; ROBERFROID, M.B., 2004, "Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concepto of prebiotics", *Nutrition Research Reviews*, v. 17, p.259-275.

GIROTO, J. M.; PAWLOWSKY, U., 2001, O soro de leite e as alternativas para o seu beneficiamento. *Brasil Alimentos*, n. 10, p. 43-46.

GLOBAL MARKET INSIGHTS, 2017, "Enzymes market, 2016–2024". Disponível em: <https://www.gminsights.com/industry-analysis/enzymes-market> Acesso em: 21 de maio de 2019.

GOSLIN, A., STEVENS, G., BARBER, A.R., KENTISH, S.E., GRAS, S.L., 2010, "Recent advances refining galactooligosaccharide production from lactose", *Food Chemistry*, v. 121 (2), p. 307-318.

GOULAS, A., TZORTZIS, G., GIBSON, G.R., 2007, "Development of a process for the production and purification of α - and β -galactooligosaccharides from *Bifidobacterium bifidum* NCIMB 41171", *Int Dairy J*, v. 17, p. 648-656.

GRANATO, D., BRANCO, G.F., NAZZARO, F., CRUZ, A.G., FARIA, J.A.F., 2010, "Functional foods and nondairy probiotic food development: trends, concepts, and products", *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, v. 9, n. 3, p.2 92-302.

GRANOTEC. *Granolact 6500 L*, 2018. Disponível em: https://granotec.com.br/granoteccombr/wp-content/uploads/2018/08/folder_lacteos_2018-web.pdf. Acesso em: 02 de junho de 2019.

GREENBERG, N.A., MAHONEY, R.R., 1982, "Production and characterization of beta-galactosidase the *Streptococcus thermophilus*", *Journal of Food Science*, v. 47, p. 1824-1828.

GROSOVÁ, Z., ROSENBERG, M., REBROS, M., 2008, "Perspectives and applications of immobilized β -galactosidase in food industry – a review", *Czech Journal of Food Science*, v. 26, p. 1-14.

GRUNWALD, P., 2009, *Biocatalysis: Biochemical Fundamentals and Application*, London, Imperial College Press, 1035 p.

GUERRERO, C., ABURTOA, C., SUÁREZA, S., VERA, C., ILLANESA, A., 2018, "Effect of the type of immobilization of β -galactosidase on the yield and selectivity of synthesis of transgalactosylated oligosaccharides", *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 16, p. 353–363.

GUERRERO, C., VALDIVIAA, F., UBILLAA, C., RAMÍREZA, N., GÓMEZA, M., ABURTOA, C., CARLOS, V., ILLANESA, A., 2019, "Continuous enzymatic synthesis of lactulose in packed-bed reactor with immobilized *Aspergillus oryzae* β -galactosidase", *Bioresource Technology*, v. 278, p. 296–302.

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

GUISÁN, J. M., 1988, "Aldehyde-agarose gels as activated supports for immobilization-stabilization of enzymes", *Enzyme and Microbial Technology*, v. 10, p. 375-382.

GUZIK, U., HUPERT-KOCUREK, K., WOJCIESZYNSKA, D., 2014, "Immobilization as a strategy for improving enzyme properties-application to oxidoreductases", *Molecules*, v. 19, n. 7, p. 8995-9018.

- HA, E., ZEMEL, M.B., 2003. "Functional properties of whey, whey components, and essential amino acids: mechanisms underlying health benefits for active people (Review)", *Journal of Nutrition Biochemistry*, v. 14, p. 251-258.
- HAIDER, T., HUSAIN, Q., 2007, "Calcium alginate entrapped preparation of *Aspergillus oryzae* β -galactosidase: its stability and applications in the hydrolysis of lactose", *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 41, n. 1, p. 72-80.
- HAIDER, T., HUSAIN, Q., 2009, "Hydrolysis of milk/whey lactose by β -galactosidase: A comparative study of stirred batch process and packed bed reactor prepared with calcium alginate entrapped enzyme", *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, v. 48, p. 576-580.
- HAIR, M.L., HERLT, W., 1970, "Acidity of surface hydroxyl groups", *Journal of Physical Chemistry*, v. 74, p. 91-94.
- HALL, A., KASSA, T., DEMISSIE, T., DEGEFIE, T., LEE, S., 2008, "National survey of the health and nutrition of schoolchildren in Ethiopia", *Trop Med Int Heal.*, v. 13, n. 12, p. 1518-26.
- HALLIWELL, C.M., CASS, A.E.G., 2001, "A Factorial Analysis of Silanization Conditions for the Immobilization of Oligonucleotides on Glass Surfaces", *Anal. Chem.*, v. 73, p. 2476-2483.
- HANSSON, T., KAPER, T., VAN DER OOST, J., DE VOS, W.M., ADLERCREUTZ, P., 2001, "Improved oligosaccharide synthesis by protein engineering of β -glucosidase CelB from hyperthermophilic *Pyrococcus furiosus*", *Biotechnol Bioengr*, v. 73, p. 203-120,
- HERNANDEZ, R.; ASENJO, J. A, 1982, "Production and characterization of an enzymatic hydrolysate of skim milk lactose and proteins", *J. Food Sci.*, v. 47, p.1895-1898.
- HEYMAN, M.B., 2006, "Lactose intolerance in infants, children and adolescents", *American Academy of Pediatrics*, v. 118, n. 3.
- HIRAYAMA, M., 2002, "Novel physiological functions of oligosaccharides", *Pure and Applied Chemistry*, v. 74, n. 1-4, p. 1271.
- HOBMAN, P.G., 1984, "Review of process and products for utilization of lactose in deproteinated milk serum", *Journal of Dairy Science*, v. 67, n. 11, p. 2630-2653.
- HSU, C.A., LEE, S.L., CHOU, C.C., 2007, "Enzymatic production of galactooligosaccharides by β -galactosidase from *Bifidobacterium longum* BCRC 15708", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 55, p. 2225-2230.

HUBER, R.E., KURZ, G., WALLENFELS, K.A., 1976, "A quantitation of the factors which affect the hydrolase and the trasgalactosylase activities of β -galactosidase (*E. coli*) on lactose", *Biochemistry*, v. 15, n. 9, p. 1994-2001.

HUERTA, L., VERA, C., GUERRERO, C., WILSON, L., ILLANES, A., 2011, "Synthesis of galacto-oligosaccharides at very high lactose concentrations with immobilized b-galactosidases from *Aspergillus oryzae*", *Process Biochem*, v. 46, p. 245–252.

HULST, A. C., TRAMPER, J., 1989, "Immobilized plant cells: a literature survey", *Enzyme and Microbial Technology*, v. 11, p. 66-73.

HULTIN, H.O., 1983, "Current and potential uses of immobilized enzymes", *Food Technology*, v. 37, n. 10, p. 66-82.

ILER, R.K., 1979, *The Chemistry of Silica*. New York: John Wiley & Sons.

ILLANES, A., VERA, C., WILSON, L., 2016, "Enzymatic Production of Galacto-Oligosaccharides", *Lactose-Derived Prebiotics*, p. 111-189.

IWASAKI, K., NAKAJIMA, M., NAKAO, S., 1996, "Galacto-oligosaccharide production from lactose by an enzymatic batch reaction using β -Galactosidase", *Process Biochem*, v. 3, p. 69-76.

JAL, P.K., PATEL, S., MISHRA, B.K., 2004, "Chemical modification of surface by immobilization of functional groups for extractive concentration of metal ions", *Talanta*, v. 62, p. 1005-1028.

JELLEMA, P.; SCHELLEVIS, F.G.; VAN DER WINDT, D.A.W.M.; KNEEPKENS, C.M.F.; VAN DER HORST, H.E., 2010, "Lactose malabsorption and intolerance: a systematic review on the diagnostic value of gastrointestinal symptoms and self-reported milk intolerance", *Q J M – An International Journal of Medicine*, v. 103, n. 8, p. 555-572.

JI, E-S., PARK, N-H., OH, D-K., 2005, "Galacto-oligosaccharide production by a thermostable recombinant b-galactosidase from *Thermotoga maritime*", *World J Microbiol Biotechnol*, v. 1, p. 759-764.

JIMENEZ, J.L.D., FERNANDEZ-SUÁREZ, A., RUIZ-TAJUELOS, S., PUENTE-GUTIÉRREZ, J.J., CERESO-RUIZ, A., 2014, "Lactose tolerance test shortened to 30 minutes: An exploratory study of its feasibility and impact", *Revista Espanhola de Enfermidades Digestivas*, v. 106, n. 6, p. 381-385.

JURADO, E., CAMACHO, F., LUZÓN, G., & VICARIA, J.M., 2004, "Kinetic models of activity for β -galactosidases: Influence of pH, ionic concentration and temperature", *Enz. Microb. Technol.*, v. 34, n. 1, p. m33-40.

JURADO, E., CAMACHO, F., LUZON, G., VICARIA, J. M., 2002, "A new kinetic model proposed for hydrolysis of lactose by β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*", *Enzyme and Microbial Technology*, v. 31, p. 300-309.

KATZBAUER, B., NARODOSLAWSKY, M., MOSER, A., 1995, "Classification system for immobilization techniques", *Bioprocess Engineering*, v. 12, p. 173-179.

KELLER, R., DUNN, I.J., 1978, "Fed-batch microbial culture: models, errors and applications", *Journal Applied Chemical Biotechnology*, v. 28, p. 508-514.

KENNEDY, J.F., CABRAL, J.M.S., 1987, "Enzyme immobilization", *Enzyme Technology*, v. 72, p. 347-404.

KENNEDY, J.F., WHITE, C.A., 1985, "Principles of immobilization of enzymes", In: WISEMAN, A., ed. Handbook of Enzyme biotechnology, 2nd ed., Chichester, John Wiley & Sons.

KENT, C., ROSEVAR, A., THOMSON, A.R., 1978, "Enzymes immobilized on inorganic supports", In: WISEMAN, A., ed. Topics in enzyme and fermentation biotechnology, Chichester, John Wiley & Sons, vol. 2.

KHAN, M., HUSAIN, Q., BUSHRA, R., 2017, "Immobilization of β -galactosidase on surface modified cobalt/multiwalled carbon nanotube nanocomposite improves enzyme stability and resistance to inhibitor", *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 105, p. 693-701,

KHORASHEH, F., KHEIROLOMOOM, A., MIRESHGHI, S., 2002, "Application of an optimization algorithm for estimation intrinsic kinetic parameters of immobilized enzyme", *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 94, n. 1, p.1-7.

KIM, C.R., LEE, S.R., LEE, Y.K., 1990, "Formation of galactooligosaccharides by the partially purified β -galactosidase from *Aspergillus niger* CAD 1", *Hanguk Chuksan Hakhoechi*, v. 32, p. 323-356.

KIM, J., LEE, D., LEE, J., 2001, "Production of galactooligosaccharide by beta-galactosidase from *Kluyveromyces marxianus* var lactis OE-20", *Biotechnol Bioprocess Engr*, v. 6, p. 337-340.

KLEIN, M.P., NUNES, M.R., RODRIGUES, R.C., BENVENUTTI, E.V., COSTA, T.M.H., HERTZ, P.F., NINOW, J.L., 2012, "Effect of the support size on the properties of β -galactosidase immobilized on chitosan: advantages and disadvantages of macro and nanoparticles, *Biomacromolecules*, v. 13, p. 2456-2464.

KOSSEVA, M.R., PANESAR, P.S., KAUR, G., KENNEDY, J.F., 2009, "Use of immobilised biocatalysts in the processing of cheese whey", *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 45, n. 5, p. 437-447, 2009.

KUMAR, A., KUMAR, D., 2016, "Development of antioxidant rich fruit supplemented probiotic yogurts using free and microencapsulated *Lactobacillus*", *Journal of Food Science and Technology*, v. 53, n. 1, p. 667-675.

LACTAID. *Lactaid Fast Act.*, 2018 Disponível em: <https://www.lactaid.com/products/lactaid-dietary-supplements>. Acesso em 01 de junho de 2019.

LADERO, M., SANTOS, A, GARCIA, L.J., CARRASCOA, V.A., PESSELA, C.C.B., GARCIA-OCHOA, F., 2002, "Studies on the activity and the ability of β -galactosidase from *Thermus sp* and strain T2 from *Kluyveromyces fragilis*, *Enzyme and Microbial Tehcnology*, v. 30, p. 392-405.

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

LALONDE, J., MARGOLIN, A., 2002, *Immobilization of enzymes*. In: Draus K, Waldmann H (eds) *Enzyme catalysis in organic chemistry*, 2^oed. Wiley-VCH, Weinheim, p. 163-184.

LASKIN, A.I., 1985, *Enzymes and immobilized cells in biotechnology*. Biotechnology Series, The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc; California, 312p.

LEHNINGER, A.L., COX, M., NELSON, D.L., 2014, *Princípios de bioquímica de Lehninger*. 6. ed., Porto Alegre: Artmed, 1250 p.

LEVITT, M., WILT, T., SHAUKAT, A., 2013, "Clinical implication of lactose malabsorption versus lactose intolerance", *Journal of Clinical Gastroenterology*, v. 47, n. 6, p. 471-480.

LI, J.J.; ZHANG, W.; WANG, C.; YU, Q.; DAI, R.; PEI, X., 2012, "Lactococcus lactis expressing food-grade β -galactosidase alleviates lactose intolerance symptoms in post-weaning Balb/cmice", *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 96, n. 6, p. 1499-1506.

- LI, Z., XIAO, M., LU, L., LI, Y., 2008, "Production of nonmonosaccharide and high-purity galactooligosaccharides by immobilized enzyme catalysis and fermentation with immobilized yeast cells", *Process Biochemistry*, v. 43, p. 896-899.
- LIN, M.Y., DIPALMA, J.A., MARTINI, M.C., GROSS, C.J., HARLANDER, S.K., SAVAIANO, D.A., 1993, "Comparative effects of exogenous lactase (beta-galactosidase) preparations on in vivo lactose digestion", *Dig Dis Sci.*, v. 38, p. 2022-2027.
- LISBOA, C. R.; COSTA, F. A. A.; BURKERT, J. F. M.; BURKERT, C. A. V., 2012, "Síntese de galacto-oligosacarídeos a partir de lactose usando β -galactosidase comercial de *Kluyveromyces lactis*", *Brazilian Journal of Food Technology*, v. 15, n. 1, p. 30-40.
- LOMER, M.C.E, PARKES, G.C., SANDERSON, J.D., 2008, "Review article: lactose intolerance in clinical practice: myths and realities", *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, v. 27, p. 97-103.
- LONGO, G., 2006, *Influência da adição de lactase na produção de iogurtes*, Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 89p.
- LÓPEZ-GALLEGO, F., MONTES, T., FUENTES, M., ALONSO, N., GRAZU, V., BETANCOR, L., GUISÁN, J. M., FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R., 2005, "Improved stabilization of chemically aminated enzymes via multipoint covalent attachment on glyoxy support", *Journal of Biotechnology*, v. 116, n. 1, p. 1-10.
- LÓPEZ-LEIVA, M. H., GUZMAN, M., 1995, "Formation of oligosaccharides during enzymatic hydrolysis of milk whey permeates", *Process Biochemistry*, v. 30, n. 8, p. 757-762.
- LULE, V.K., GARG, S., TOMAR, S.K., DAIRY, N., 2016, "Food Intolerance: Lactose Intolerance", *Encycl. Food Health*, p. 43-48.
- MACFARLANE, G.T., STEED, H., MACFARLANE, S., 2008, "Bacterial metabolism and health-related effects of galacto-oligosaccharides and other prebiotics", *J. Appl. Microb.*, v. 104, p. 305-44.
- MACZULAK, A. E.; WOLIN, M. J.; MILLER, T. L., 1993, "Amounts of viable anaerobes, methanogens and bacterial fermentation products in feces of rats fed high-fiber or fiber-free diets", *Applied and Environmental Microbiology*, v. 59, p. 657-662.
- MAHONEY, R. R., 1998, "Galactosyl-oligosaccharide formation during lactose hydrolysis: a review", *Food Chemistry*, v. 63, p. 147-154.

MAMMARELLA, E.J., RUBIOLO, A.C., 2003, "Study of Deactivation of β -galactosidase Entrapped in Gels". SINAFERM.

MAMMARELLA, E.J., RUBIOLO, A.C., 2005, "Study of the deactivation of β -galactosidase entrapped in alginate-carrageenan gels", *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 34, p. 7-13.

MANUCCI F., 2009, *Enzymatic synthesis of galactooligosaccharides from whey permeate*. Tese - School of Food Science & Environmental Health, Dublin Institute of Technology, 183 p.

MARIOTTI, M.P., YAMANAKA, H., ARAUJO, A.R., TREVISAN, H.C., 2008, "Hydrolysis of Whey Lactose by Immobilized β -Galactosidase", *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 51, n. 6, p. 1233-1240.

MARTINEZ-VILLALUENGA, C., CARDELLE-COBAS, A., CORZO, N., OLANO, A., 2008, "Study of galactooligosaccharide composition in commercial fermented milks", *J Food Compos Anal*, v. 21, p. 540-544.

MARTINS, A. R., BURKERT, C.A.V., 2009, "Revisão-Galacto-oligossacarídeos (GOS) e seus efeitos prebióticos e bifidogênicos", *Braz J Food Technol*, v. 12, n. 3, p. 230-40.

MATEO, C., GRAZU, V., PESSELA, B.C.C., MONTES, T., PALOMO, J.M., TORRES, R., LOPEZ-GALLEGO, F., FERNANDEZ-LAFUENTE, R., GUIZAN, J.M., 2007a, "Advances in the design of new epoxy supports for enzyme immobilization-stabilization", *Biochemical Society Transactions*, v. 35, p. 1593-1601.

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

MATIOLI, G., MORAES, F. F., ZANIN, G. M., 2001, "Hydrolysis of lactose by betagalactosidase from *Kluyveromyces fragilis*: characterization of the enzyme", *Acta Scientiarum, Maringá*, v. 23, p. 655-659.

MATIOLI, G.; MORAES, F. F.; ZANIN, G. M., 2003, "Operational stability and kinetics of lactose hydrolysis by β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*", *Acta Scientiarum, Maringá*, v. 25, n. 1, p. 7-12.

MATSUMOTO, K.; TAKADA, T.; YUKI, N.; KAWAKAMI, K.; SAKAI, T.; NOMOTO, K.; KIMURA, K.; MATSUMOTO, K.; LINO, H., 2004, "Effects of transgalactosylated

oligosaccharides mixture (N-GOS) on human intestinal microflora”, *Chonai Saikingaku Zasshi*, v. 18, p. 25–35.

MATTAR, R., MAZO, D. F. C.; CARRILHO, F., 2012, “Lactose intolerance: diagnosis, genetic, and clinical factors”, *Clinical and Experimental Gastroenterology*, v. 5, p. 113-121.

MATTHEWS, M.E., 1984, “Whey protein recovery process and products”, *Journal of Dairy Science*, v. 67, n. 11, p. 2680-2692.

MATTILA-SANDHOLM, T., MYLLARINEN, P., CRITTENDEN, R., MOGENSEN, G., FONDEN, R., SAARELA, M., 2002, “Technological challenges for future probiotic foods”, *Int. Dairy J.*, v. 12, n. 2/3, p. 173-182.

MAUGARD, T., GAUNT, D., DOMINIQUE LEGOY, M., BESSON, T., 2003, “Microwave-assisted synthesis of galacto-oligosaccharides from lactose with immobilized β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*”, *Biotechnology Letters*, v. 25, p. 623-629.

MAWSON, A.J., 1994, “Bioconversion of whey utilization and waste abatement”, *Bioresource Technology*, v. 47, p. 195-203.

MAXINUTRI. *Deslac Lactase*, 2019. Disponível em: <http://www.deslac.com.br/lactase/> Acesso em 01 de junho de 2019.

MENDES, A.A.; OLIVEIRA, P.C.; CASTRO, F.C.; GIORDANO, R.L.C., 2011, “Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial”, *Química Nova*, v. 34, n. 5, p. 831-840.

MICHELON, M., MANERA, A.P., CARVALHO, A.L., FILHO, F.M., 2014, “Concentration and purification of galactooligosaccharides using nanofiltration membranes”, *International Journal of Food Science and Technology*, v. 49, p. 1953-1961.

MISSELWITZ, B.; POHL, D.; FRÜHAUF, H.; FRIED, M.; VAVRICKA, S.R.; FOX, M., 2013, “Lactose malabsorption and intolerance pathogenesis, diagnosis and treatment”, *United Europea Gastroenterology Journal*, v. 1, n. 3, p. 151-159.

MONSAN, P.; PAUL, F., 1995, “Enzymatic synthesis of oligosaccharides”, *FEMS Microbiology Reviews*, Malden, v. 16, n. 5, p. 187-192.

MORIWAC, C., MATIOLI, G., 2000, “Influência da β -galactosidase na tecnologia do leite e na má digestão da lactose”, *Arquivo de Ciências da Saúde Unipar*, v. 4, n. 3, p. 283-290.

MOZAFFAR, Z., NAKANISHI, K., MATSUNO, R., 1984, "Purification and properties of beta-galactosidases from *Bacillus circulans*", *Agricultural Biological Chemistry*, Tokio, v. 48, n. 12, p. 3053-3061.

MOZHAEV, V.V., MELIK-NUBAROV, N.S., SERGEEVA, M.V., SIKRIS, V., MARTINEK, K., 1990, "Strategy for stabilizing enzymes part one: Increasing stability of enzymes via their multipoint interaction with a support", v. 3, p. 179-187.

MUSSATTO, S.I., MANCILHA, I.M., 2007, "Non-digestible oligosaccharides: a review", *Carbohydrate Polymers*, v. 68, n. 3, p.587-597.

MUWIZ. *Revista Muwiz – Enzima lactase*, 2018. Disponível em: <https://muwiz.com.br/revista/revista-muwiz.pdf>. Acesso e 30 de maio de 2019.

NAKAO, M., HARADA, M., KODAMA, Y., NAKAYAMA, T., SHIBANO, Y., AMACHI, T., 1994, "Purification and characterization of a thermostable/3-galactosidase with high transgalactosylation activity from *Saccharopolyspora rectivirgula*", *Appl Microbiol Biotechnol*, v. 40, p. 657-663.

NAKAYAMA, T., AMACHI, T., 1999, "β-Galactosidase, enzymology", In *Encyclopedia of Bioprocess Technology: Fermentation, Biocatalysis, and Bioseparation*; Flickinger, M. C., Drew, S. W., Eds.; Wiley, v. 3, p. 1291–1305.

NARANJO, G.B., PEREYRA GONZALES, A.S., LEIVA, G.E., MALEC, L.S., 2013, "The kinetics of Maillard reaction in lactose-hydrolysed milk powder and related systems containing carbohydrate mixture", *Food Chem.*, v. 141, n. 4, p. 3790-3795.

NELSON, D., COX, M., 2013, *Lehninger principles of biochemistry*. 6. ed. New York: W. H. Freeman.

NERI, D.F., 2008, *Immobilization of B-galactosidase onto different water insoluble matrices*. Tese [Doutorado em Engenharia Química e Biológica] - Universidade do Minho.

NETZ, P.A., ORTEGA, G.G., 2002, *Fundamentos de Físico-Química – Uma abordagem conceitual para as ciências farmacêuticas*. 2. Ed. São Paulo: Artmed.

NIVETHA, A.; MOHANASRINIVASAN, V., 2017, "Mini review on role of β-galactosidase in lactose intolerance", *IOP Conf. Series: Materials Science and Engineering*, v. 263.

NOVO, 1979, *Application of yeast lactase: a review*. Bagsvaerd: Novo Nordisk, p.28. Novo's file number A 5489.

NOVOZYMES. *Lactozym Pure*, 2018. Disponível em: <http://www.ncbe.reading.ac.uk/MATERIALS/Enzymes/lactozym.html>. Acesso em: 01 de junho de 2019.

NUNES, L.; SANTOS, M. G., 2015, “Caracterização físico-química de soros obtidos de diferentes tipos de queijos”, *Horizonte Científico*, v. 9, n. 2.

OBÓN, J.M., CASTELLAR, M.R., IBORRA, J.L., MANJÓN, A., 2000, “ β -galactosidase immobilization for milk lactose hydrolysis: a simple experimental and modeling study of batch and contínuos reactors”, *Biochemical education*, v. 28, n. 3, p. 164-168.

OLIVEIRA, D, VIDAL, L., ARES, G., WALTER, E.H.M., ROSENTHAL, A., DELIZA, R., 2017, “Sensory, microbiological and physicochemical screening of probiotic cultures for the development of non-fermented probiotic milk”, *LWT – Food Science and Technology*, v. 79, p. 234-241.

OLIVEIRA, D.F.; BRAVO, C.E.C; TONIAL, I.B., 2012, “Soro de leite: um subproduto valioso”, *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, v. 67, n. 385, p. 64-71.

ONISHI, N., TANAKA, T., 1995, “Purification and properties of a novel thermostable galacto-oligosaccharide-producing β -galactosidase from *Sterigmatomyces elviae* CBS8119”, *Appl Environmental Microbiol*, v. 61, p. 4026-4030.

ONISHI, N., TANAKA, T., 1998, “Galacto-oligosaccharide production using a recycling cell culture of *Sterigmatomyces elviae* CBS8119”, *Lett Appl Microbiol*, v. 26, n. 2, p. 136-139.

ONISHI, N., YOKOZEKI, K., 1996, “Gluco-oligosaccharide and galactooligosaccharide production by *Rhodotorula minuta* IFO879”, *J Ferment Bioeng*, v. 82, n. 2, p. 124-127.

ORDÓÑEZ, J.A., 2005, *Tecnologia de Alimentos*. São Paulo: Artmed. 279p.

ORTEGA-ZARZOSA, G., ARAUJO-ANDRADE, C., COMPEÁN-JASSO, M.E., MARTÍNEZ, J.R., 2002, “Cobalt oxide/silica xerogels powders: X-ray diffraction, infrared and visible absorption studies”, *J. Sol-gel Sci. Technol.*, v. 13, p. 445-449.

OSMAN, A., 2016, “Synthesis of Prebiotic Galacto- Oligosaccharides”, *Science and Technology*, p 135–154.

OTIENO, D. O., 2010, “Synthesis of β -Galactooligosaccharides from lactose using microbial β -Galactosidases”, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, v. 9, p. 474.

OZBEK, B., SENNER, N., APAR, D. K. A., 2006, "Modelling study on milk lactose hydrolysis and β -galactosidase stability under sonication", *Process Biochemistry*, v. 41, p. 1493–1500.

OZDURAL, A.R., TANYOLAÇ, D., BOYACI, I.H., MUTLU, M., WEBB, C., 2003, "Determination of apparent kinetic parameters for competitive product inhibition in packed-bed immobilized enzyme reactors", *Biochemical Engineering Journal*, v. 14, p. 27-36.

PABOUEF, V., MOREIRA, O., SILVAA, E.C., CORREIA, L.F.M., CARVALHO, A.F., 2012, "Processo de fabricação de ricota por ultrafiltração". Indústria – Milkpoint, Disponível em: <https://www.milkpoint.com.br/artigos/industria/processo-de-fabricacao-de-ricota-por-ultrafiltracao-204521n.aspx> Acesso: 22 maio de 2019.

PACHECO, M.T.B., DIAS, N.F.G., BALDINI, V.L.S, TANIKAWA, C., SGARBIERI, V.C., 2005, "Propriedades funcionais de hidrolisados obtidos a partir de concentrados protéicos de soro de leite", *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 25, n. 2, p. 333-338.

PALAI, T., BHATTACHARYA, P.K., 2013, "Kinetics of lactose conversion to galacto-oligosaccharides by β -galactosidase immobilized on PVDF membrane", *J. Biosci. Bioeng.*, v. 115, p. 668-673.

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

PAPAYANNAKOS, N., MARKAS, G., KEKKOS, D., 1993, "Studies on modelling and simulation of lactose hydrolysis by free and immobilized β -galactosidase from *Aspergillus niger*", *The Chemical Engineering Journal*, v. 52, n. 1, p. B1-B2.

PARK, A.R., OH, D.K., 2010, "Galacto-oligosaccharide production using microbial β -galactosidase: current state perspectives", *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 35, n. 5, p. 1279-1286.

PASSOS, L.M., PARK, Y.K., 2003, "Fruto-oligosacarídeos: implicações na saúde humana e uso em alimentos", *Ciênc Rural*, v. 33, n. 2, p. 385-390.

PAZUR, J.H., 1954, "The mechanism of enzymatic synthesis of galactosyl oligosaccharides", *J Biol Chem*, v. 208, p. 439-444.

PENNA, A.L.B., ALMEIDA, K.E., OLIVEIRA, M.N., 2009, “Soro de leite: Importância Biológica, Comercial e Industrial – principais produtos”, In: OLIVEIRA, M.N.R. (Ed.). Tecnologia de produtos lácteos funcionais. 1. Ed. São Paulo: Atheneu, p. 251-276.

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

PEREIRA, M.C.S., BRUMANO, L.P., KAMIYAMA, C.M., PEREIRA, J.P.F., RODARTE, M.P., PINTO, M.A.O., 2012, “Lácteos com baixo teor de lactose: uma necessidade para portadores de má digestão da lactose e um nicho de mercado”, *Rev. Inst. Latic. “Cândido Tostes”*, v. 67, n. 389, p. 57-65.

PEREIRA-RODRÍGUEZ, Á., FERNÁNDEZ-LEIRO, R., GONZÁLEZ-SISO, M.I., CERDÁR, M.E., BECERRA, M., SANZ-APARICIO, I., 2012, “Structural basis of specificity in tetramic *Kluyveromices lactis* β -galactosidase”, *Journal PF Structural Biology*, v. 177, n. 2, p. 392-401.

PFLANZER, S.B., CRUZ, A.G., HATANAKA, C.L, MAMEDE, P.L, CADENA, R., FARIA, J.A.F., SILVA, M.A.A.P., 2010, “Perfil sensorial e aceitação de bebida láctea achocolatada”, *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 30, n. 2, p. 391-398.

PORTO, L.M., SANTOS, R.C., MIRANDA, T.L.S., 2005 “Determinação das melhores condições operacionais do processo de produção de ricota”, *Boletim CEPPA*, v. 23, n. 1, p. 173-182.

PRAZERES, A.R., CARVALHO, F, RIVAS, J., 2012, “Cheese whey management: A review”, *Journal of Environmental Management*, v. 110, p. 48-68.

PRENOSIL, J.E., STUKER, E. & BOURNE, J.R., 1987, “Formation of oligosaccharides during enzymatic lactose: part I: State of Art”, *Biotechnology and Bioengineering*, v. 30, p. 1019-1028.

PRETTO, F.M., SILVEIRA, T.R., MENEGAZ, V., OLIVEIRA, J., 2002, “Má absorção de lactose em crianças e adolescentes: diagnóstico através do teste de hidrogênio expirado com o leite de vaca como substrato”, *Jornal de Pediatria*, v. 78, n. 3, p. 213-218.

QING, Q., LI, H., HUMAR, R., WYMAN, C.E., 2013, “Xylooligosaccharides Production, Quantification, and Characterization in Context of Lignocellulosic Biomass Pretreatment”. In: *Aqueous Pretreatment of Plant Biomass for Biological and Chemical Conversion to Fuels and Chemicals*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd. p. 391–415.

REDDIT, 2018, *Lactose Intolerance map of the world*. Disponível em: https://www.reddit.com/r/MapPorn/comments/76qlo2/lactose_intolerance_map_of_the_world_2535x1263/ Acesso: 21 de março de 2019.

REED, G., NAGODAWITHANA, T., 1993, *Enzymes in Food Processing*. New York, academic Press. 3ª ed.

REETZ, M.T., JAEGER, K.E., 1998, "Overexpression, immobilization and biotechnological application of *Pseudomonas* lipases", *Chemistry and Physics of Lipids*, v. 93, p. 3-14.

REZAEI, H., ASHTIANI, F., FOULADITAJAR, A., 2011, "Effects of operating parameters on fouling mechanism and membrane flux in cross-flow microfiltration of whey", *Desalination*, v. 274, n. 1-3, p. 262-271.

RICANATA, 2019, Loja virtual para laticínios – lactase. Disponível em: <https://www.ricanata.com.br/lactase#.Wk-nbiMWpmA> Acesso em: 22 de maio de 2019.

RIVERO-URGELL, M.; SANTAMARIA-ORLEANS, A. SEUMA, M.R.P., 2005, "La importancia de los ingredientes funcionales en las leches y cereales infantiles", *Nutricion Hospitalaria*, v. 20, n. 2, p. 135-146.

ROBERFROID, M.; SLAVIN, J., 2000, "Non digestible oligosaccharides", *Critical Reviews in Food Sciences and Nutrition*, v. 46, p. 461-480.

RODRIGUES JÚNIOR, P.H., DE SÁ OLIVEIRA, K., DE ALMEIDA, C.E., DE OLIVEIRA, L.F., STEPHANI, R., PINTO, M.D.A.S., DE CARVALHO, A.F., PERRONE, Í.T., 2016, "FT-Raman and chemometric tools for rapid determination of quality parameters in milk powder: Classification of samples for the presence of lactose and fraud detection by addition of maltodextrin", *Food Chem.*, v. 196, p. 584-588.

ROSADO, J.L., SOLOMONS, N.W., LISKER, R., BOURGES, H., 1984, "Enzyme replacement therapy for primary adult lactase deficiency. Effective reduction of lactose malabsorption and milk intolerance by direct addition of beta-galactosidase to milk at mealtime", *Gastroenterology*, v. 87, p. 1072-1082.

ROSKAR, I.; SBIGELJ, K.; STEMPELJ, K.; VOLFAND, J.; STARBUC, B.; MALOVRH, S., 2017, "Effects of a product containing *Bifidobacterium animalis* subsp. *animalis* IM386 and *Lactobacillus plantarum* MP2026 in lactose intolerant individuals: Randomized, placebo-controlled clinical trial", *Journal of Functional Foods*, v. 35, p. 1-8.

ROSSETTO, B. P., 2013, *Síntese de galacto-oligossacarídeos a partir de soro de queijo por reação enzimática*, Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Estadual de Maringá, Maringá – PR, 64p.

RUCKENSTEIN, E., LI, Z.F., 2005, “Surface modification and functionalization through the self-assembled monolayer and graft polymerization”, *Adv. Colloid Interface Sci*, v. 113, p. 43–63.

RUPÉREZ, 1998, “P. Bifidogenic oligosaccharides”, *Food Sci Technol Int*, v. 4, n. 4, p. 237-43.

RUSTOM, I.; FODA, M., LOPEZ-LEIVA, M. H., 1998, “Formation of oligosaccharides from whey UF-permeate by enzymatic hydrolysis-analysis of factors”. *Food Chem.*, v. 62, n. 2, p. 141-147.

SAAD, S. M. I., 2006, “Probióticos e Prebióticos: o estado da arte”, *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 42, n. 1, 1-16.

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

SANGEETHA, P.T., RAMESH, M.N., PRAPULLA, S.G., 2005, “Recent trends in the microbial production, analysis and application of Fructooligosaccharides”, *Trends in Food Science & Technology*. v. 16, n. 10, p. 442-457.

SANGWAN, V., TOMAR, S.K., SINGH, R.R., SINGH, A.K., ALI, B., 2011, “Galactooligosaccharides: Novel Components of Designer Foods”, *Journal of Food Science*, v. 76, n. 4, p. 106-111.

SANTIAGO, P. A., MARQUEZ, L. D. S., CARDOSO, V.L., RIBEIRO, E.J., 2004, “Estudo da produção de β -galactosidase por fermentação de soro de queijo com *Kluyveromyces marxianus*”, *Revista Ciencia e Tecnologia de Alimentos*, v. 24, n. 4.

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

SANTOS, R.; SIMIQUELI, A. P. R.; PASTORE, G. M., 2009, "Produção de galacto-oligosacarídeo por *Scopulariopsis sp.*", *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. v. 29, n. 3, p. 682-689.

SANZ VALERO, J.I., 2009, *Production of galacto-oligosaccharides from lactose by immobilized β -galactosidase and posterior chromatographic separation*. Tese [Doutorado em Engenharia Química e Biomolecular] - Ohio State University.

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

SAVAIANO, D.A., 2014, "Lactose digestion from yogurt: mechanism and relevance", *Am J Clin Nutr.*, v. 99, n. 5, p. 1251S-1255S.

SCHMIDELL, W., LIMA, U.A., AQUARONE, E., BORZANI, W., 2001, *Biotecnologia Industrial – Engenharia Bioquímica – v.2*. Editora Edgard Blucher LTDA, Brasil.

SEAB - SECRETARIA DE ESTADO DA AGRICULTURA E DO ABASTECIMENTO, 2017, "Leite – Análise da conjuntura agropecuária – ano 2016/17". Curitiba. Disponível em: http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/Prognosticos/2017/leite_2016_17.pdf
Acesso em: 21 de maio de 2019.

SECHI, G., SECHI, E., FOIS, C., KUMAR, N., 2016, "Advances in clinical determinants and neurological manifestations of B vitamin deficiency in adults", *Nutr Rev.*, v. 74, n. 5, p. 281-300.

SEED, B., 2001, Silanizing Glasware, In *Current Protocols in Cell Biology* John Wiley & Sons, Inc.

SEGEL, I.H., 1993, "Enzyme Kinetics", New York, John Wiley.

SGARBIERI, V.C., 2004, "Propriedades fisiológicas-funcionais das proteínas do soro de leite", *Revista de Nutrição*, Campinas, v. 17n. 4, p. 397-409.

SHAUKAT, A., LEVITT, M.D., TAYLOR, B.C., MACDONALD, R., SHAMLIYAN, T.A., KANE, R.L., WILT, T.J., 2010, "Systematic review: effective management strategies for lactose intolerance", *Ann Intern Med.*, v. 152, n.12, p. 797-803.

SHELDON, R.A., WOUDEBERG-VAN OOSTEROM, M., VAN BELLE, H.J.A., VAN RANTWIJK, F., 1998, "Immobilized β -galactosidase and their use in galactosidase synthesis", *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, v. 134, p. 26-274.

SHENDURSE, A.M.; KHEDKAR, C.D., 2016, Lactose, In: CABALLERO, B.; FINGLAS P.; TOLDRA, F. *Encyclopedia of Food and Health*. San Diego: Elsevier, p.509-516.

SHEU, D., LI, S., DUAN, K., CHEN, C.W., 1998, "Production of galactooligosaccharides by β -galactosidase immobilized on glutaraldehyde-treated chitosan beads", *Biotechnology Techniques*, v. 12(4), p. 273-276.

SHILS, M.E., CABALLERO, B., COUSINS, R.J., SHIKE, M., ROSS, A.C., 2009, *Nutrição Moderna: Na saúde e Na doença*, 10 ed. São Paulo: Manole; 2222 p.

SHIN, H-J., YANG, J-W., 1994, "Galacto-oligosaccharide production by β galactosidase in hydrophobic organic media", *Biotechnol Lett.*, v. 16, p. 1157–1162.

SHU, C., CAI, J., HUANG, L., ZHU, X., XU, Z., 2011, "Biocatalytic production of ethyl butyrate from butyric acid with immobilized *Candida rugosa* lipase on cotton cloth", *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 72: 139-144.

SIGMA ALDRICH., 2018a, *B-galactosidase from Aspergillus oryzae*. Disponível em: https://www.sigmaaldrich.com/Graphics/COofAInfo/SigmaSAPQM/SPEC/G5/G5160/G5160BULK_SIGMA_.pdf Acesso em: 15 de maio de 2019.

SIGMA ALDRICH., 2018b, *B-galactosidase from Escherichia coli*. Disponível em: https://www.sigmaaldrich.com/Graphics/COofAInfo/SigmaSAPQM/SPEC/G4/G4155/G4155-BULK_SIGMA_.pdf Acesso em: 15 de maio de 2019.

SIGMA ALDRICH., 2018c, *B-galactosidase from Kluyveromyces lactis*. Disponível em: https://www.sigmaaldrich.com/Graphics/COofAInfo/SigmaSAPQM/SPEC/G3/G3665/G3665-BULK_SIGMA_.pdf Acesso em: 15 de maio de 2019.

SILK, D.B.A., DAVIS, A., VULEVIC, J., TZORTZIS, G., GIBSON, G.R., 2009, "Clinical trial: the effects of a trans-galactooligosaccharide prebiotic on fecal microbiota and symptoms in irritable bowel syndrome", *Aliment. Pharmacol. Ther.*, v. 29, p. 508–518.

SILVA, M. S. S., FIGUEIRÊDO, R.M.F., QUEIROZ, A.I.M., SANTIAGO, V.M.S., 2011, "Avaliação físico-química e sensorial de doces cremosos produzidos com soro de leite de cabra, leite de vaca e polpa de umbu", *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, v. 13, n. especial, p. 397-410.

SILVA, R.G., SOUZA, V.R., NUCCI, E.R., PINOTTI, L.M., CRUZ, A.J.G., GIORDANO, R.C., GIORDANO, R.L.C., 2003, "Produção de penicilina G acilase por *Bacillus megaterium* ATCC 14945 com aminoácidos livres em batelada alimentada", *Anais do XIV Sinaferm 2003*.

SILVÉRIO, S.C, MACEDO, G.A., TEIXEIRA, J.A., RODRIGUES, L.R., 2018, "New β -galactosidase producers with potential for prebiotic synthesis", *Bioresource Technology*, v. 250, p. 131–139.

SINCLAIR, H.R., DE SLEGTE, J., GIBSON, G.R., RASTALL, R.A., 2009, "Galactooligosaccharides (GOS) inhibit *Vibrio cholerae* toxin binding to its GM1 receptor", *J. Agric. Food Chem.*, v. 57, p. 3113–3119.

SKOOG, F., WEST, C., HOLLER, M., CROUCH, H., 2008, *Fundamentos de Química Analítica*. 8. Ed. Editora Thomson.

SLAVIN, J., 2013, "Fiber and prebiotics: mechanisms and health benefits", *Nutrients Reviews*, v. 5, n. 3, p. 1417-1435.

SOBRAL, K. A., RODRIGUEZ, R. O., OLIVEIRA, R. D., OLIVO, J. E., MORAES, F. F. de, ZANIN, G. M., 2003, "Evaluation of supports and methods for immobilization of enzyme cyclodextringlycosyltransferase", *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 105-108, p. 809-819.

SOBRAL, K. C. A., RODRIGUEZ, R. M. O., OLIVEIRA, R. D., MORAES, F. F., ZANIN, G. M., 2002, "Immobilization of cyclodextringlycosyltransferase (CGTase) from *Bacillus firmus* in commercial chitosan", *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, v. 44, p. 383-386.

SOLOMONS, N.W., GUERRERO, A.M., TORUN, B., 1985, "Dietary manipulation of postprandial colonic lactose fermentation: II. Addition of exogenous, microbial betagalactosidases at meal time", *Am J Clin Nutr.*, v. 41, p. 209-221.

SOMMER, A., DAVIDSON, F.R., ANNECY, A., 2002, "Assessment and control of vitamin A deficiency: The Anancy Accords", *J Nutr.*, v. 132, n. 9, p. 2845S-2450S.

SONG, S.W., HIDAJAT, K., KAWI, S., 2005, "Functionalized SBA-15 materials as carries for controlled drug delivery: influence of surface properties on matrix-drug interactions". *Langmuir*, v. 21, p. 9568 – 9575.

SOORO, 2019. *Permeado de Soro de Leite*. Disponível em: <http://www.sooro.com.br/produto/6/permeado-de-soro-de-leite> Acesso: 22 maio de 2019.

SOUZA, R.R., BERGAMASCO, R., COSTA, S.C., FENG, X., FARIA, S.H.B., GIMENES, M.L., 2010, "Recovery and purification of lactose from whey", *Chemical Engineering and Processing*, v. 49, p. 1137–1143.

SPARVOLI, A.C., 1989, "Má absorção de lactose do adulto em uma população nordestina", Campinas: Ed. da Unicamp.

SPLECHTNA, B., NGUYEN, T-H., HALTRICH, D., 2007, "Comparison between discontinuous and continuous lactose conversion processes for the production of prebiotic galacto-oligosaccharides using β -galactosidase from *Lactobacillus reuteri*," *J Agric Food Chem.*, v. 55, p. 6772–6777.

STRZALKOWSKA, N.; JASÍNSKA, K.; JÓZWIK, A., 2018, "Physico-chemical properties of lactose, reasons for and effects of it intolerance in humans – a review." *Animal Science Papers and Reports*, v. 3, n. 1, p. 21-31.

SUN, H., YOU, S., WANG, M., QI, W., SU, R., HE, Z., 2016, "Recyclable strategy for the production of high-purity galacto-oligosaccharides by *Kluyveromyces lactis*", *J Agric Food Chem.*, v. 64, n. 28, p. 5679–5685.

SWANSON, 2019. *Kal Lactase Enzyme*. Disponível em: <https://www.swansonvitamins.com/kal-lactase-enzyme-250-mg-60-sgels>. Acesso em: 10 maio de 2019.

TANAKA, A., KAWAMOTO, T., 1999, *Cell and enzyme immobilization*. The American Society for Microbiology, Washington, DC, USA.

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

TARDIOLI, P.W., FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R., GUISÁN, J.M. GIORDANO, R.L.C., 2003a, "Design of new immobilized-stabilized carboxypeptidase A derivative for production of aromatic free hydrolysates of proteins", *Biotechnology Progress*, v. 19, p. 565-574.

TARDIOLI, P.W., PEDROCHE, J., GIORDANO, R.L.C., FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R., GUISÁN, J.M., 2003b, "Hydrolysis of proteins by immobilized-stabilized Alcalase-glyoxyl agarose", *Biotechnology Progress*, v. 19, p. 352-360.

TEIXEIRA, G.A., BRITO, A.M., LOPES, L.F., FINZER, J.R.D.; MALAGONI, R.A., 2013, *Um estudo experimental sobre a cristalização de lactose utilizando leite vibrado*. Anais XXXVI ENEMP.

TEIXEIRA, L. V.; FONSECA, L.M., 2008, “Perfil físico-químico do soro de queijo mozzarella e minas-padrão produzidos em várias regiões do estado de Minas Gerais”, *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 60, n.1, p. 243-250.

THAMER, K.G., PENNA, A.L.B., 2006, “Caracterização de bebidas lácteas funcionais fermentadas por probióticos e acrescidas de prebiótico”, *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 26, n. 3, p. 589-595.

TOMAL, A.A.B., CUNHA, M.E.T., BOSSO, A., YOUSSEF, E.Y., SUGUIMOTO, H.H., 2010, “Avanços Tecnológicos na Obtenção, Purificação e Identificação de Galacto-oligosacarídeos e Estudo de suas Propriedades Prébióticas”, *UNOPAR Cient Ciênc Biol Saúde*; v. 12, n. 4, p. 41-49.

TOMOMATSU, H., 1994, “Health effects of oligosaccharides”, *Food Technology*, v. 48, p. 61-65.

TORRES, D. P.M., GONÇALVES, M. P. F., TEIXEIRA, J. A., RODRIGUES, L. R., 2010, “Galacto-oligosaccharides: Production, Properties, Applications, and Significance as Prebiotics”, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. Vol. 9.

Transparency Market Research. 2014. *Prebiotics Market Will Flourish in the Forthcoming Years*. Disponível em: <http://www.transparencymarketresearch.com/article/prebiotics.htm>. Acesso: 01 de junho de 2019.

TRINDER, P., 1969, “Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor”, *Annals of Clinical Biochemistry*, v. 6, p. 24-27.

TROISE, A.D., BUONANNO, M., FIORE, A., MONTI, S.M., FOGLIANO, V., 2016, “Evolution of protein bound Maillard reaction end-products and free Amadori compounds in low lactose milk in presence of fructosamine oxidase I”, *Food Chemistry*, v. 212, p. 722-729.

TZORTZIS, G., VULEVIC, J., 2009, *Galacto-oligosaccharide prebiotics*. In: CHARALAMPOPOULOS, D.; RASTALL, R.A. (Ed). *Prebiotics and Probiotics Science and Technology*. New York: Springer, p. 207-244.

UGGIONE, P.L., FAGUNDES, R.L.M., 2006, "Tratamento dietético da intolerância à lactose infantil: teor de lactose em alimentos", *Higiene de Alimentos*, São Paulo, v. 21, n. 140, p. 24-29.

USTOK, F.I., 2007, *Production of β -galactosidase using acid bacteria and optimisation of fermentation parameters*. Thesis (Master of Science in Biotechnology) – Graduate School of Engineering and Science of Izmir Institute of Technology, 133p.

VALLET-REGÍ, M.; DOADRIO, J.C., DOADRIO, A.L., IZQUIERDO-BARBA, I., PEREZ-PARIENTE, J., 2004, "Hexagonal ordered mesoporous material as a matrix for the controlled release of amoxicillin", *Solid State Ionics*, v. 172, p. 435-439.

VANDENPLAS, Y., 2015, "Lactose intolerance. Asia Pac.", *J Clin Nutr.*, v. 24, n. 1, p. 9-13.

VANSANT, E.F., PASCAL, V., VRANCKEN, K.C., 1995, "Characterization and chemical modification of the silica surface", *Elsevier*.

VASILEVA, N., IOTOV, V., IVANOV, Y., GODJEVARGOVA, T., KOTIA, N., 2012, "Immobilization of β -galactosidase on modified polypropylene membranes", *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 51, p.710-719.

VASILEVA, N., IVANOV, V., DAMYANOVA, S., KOSTOVA, I., GODJEVARGOVA, T., 2016, "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.

VÁZQUEZ, M., ALONSO, J.L., DOMÍNGUEZ, H., PARAJÓ, J.C., 2000, "Xylooligosaccharides: manufacture and applications", *Trends in Food Science & Technology*, v. 11, n. 11, p. 387–393.

VERA, C., GUERRERO, C., ILLANES, A., CONEJEROS, R., 2011, "A pseudo steady-state model for galacto-oligosaccharides synthesis with β -galactosidase from *Aspergillus oryzae*. *Biotechnol Bioeng.*, v. 108, p. 2270-2279.

VERA, C.; GUERRERO, C.; ILLANES, A.; CONEJEROS, R., 2012, "Synthesis of galacto-oligosaccharides by β -galactosidase from *Aspergillus oryzae* using partially dissolved and supersaturated solution of lactose", *Enzyme and Microbial Technology.*, v. 50, p. 188-194.

VERA, C.; GUERRERO, C.; ILLANES, A.; CONEJEROS, R., 2014, "Fed-batch synthesis of galacto-oligosaccharides with *Aspergillus oryzae* β -galactosidase using optimal control strategy", *Biotechnol. Prog.*, v. 30, n. 1, p. 59-67.

VIGO, T.L., 1998, "Interaction of cellulose with other polymers: retrospective and prospective", *Polymers for Advanced Technologies*, v. 9, p. 539-548.

VOGEL, A. I., 1981, *Análise inorgânica quantitativa*. Rio de Janeiro: Guanabara Dois.

VORAGEN, A. G. J., 1998, "Technological aspects of functional food-related carbohydrates", *Trends in Food Science & Technology*, v. 9, p. 328- 335.

VUORISALO, T, ARJAMAA, O., VASEMÄGI, A., TAAVITSAINEN, J.P., TOURUNEN, H., SALONIEMI, I., 2012, "High lactose tolerance in north Europeans: a result of migration, not in situ milk consumption", *Perspectives in Biology and Medicine*, v. 55, n. 2, p. 163-174.

WALSTRA, P, WOUTERS, J.T., GEURTS, T. J., 2006, *Dairy Science and Technology*, 2nd ed. Florida: Taylor & Francis Group.

WALSTRA, P., JENNESS, R., 1984, *Química y física lactológica*. Zaragoza: Acribia, 423p.

WARMERDAM, A., BOOM, R.M., JANSSEN, A.E.M., 2013, "β-galactosidase stability at high substrate concentrations", *Springer Plus*, v. 2, n. 402, p. 1-18.

WIERZBICKI, L.E., KOSIKOWSKI, F.V., 1972, "Formation of oligosaccharides during β-galactosidase action on lactose", *J Dairy Sci*, v. 56, n. 11, p. 1400-1004.

XUEMEI L., ZHOU, Q.Z.K., CHEN, X.D., 2007, "Pilot-scale lactose hydrolysis using β-galactosidase immobilized on cotton fabric", *Chemical Engineering and Processing*, v. 46, p. 497-500.

YAMADA, N., YOSHINAGA, I., KATAYAMA, S., 1998, "Processing and properties of inorganic-organic hybrids containing various inorganic components", *J. Sol-gel Sci Technol.*, v. 13, p. 445-449.

YAMANE, T., SHIMIZU, S., 1984, "Fed-batch techniques in microbial process", *Adv Biochem Eng Biotechnol*, v. 30, p. 147-194.

YANG, L. M., WANG, Y. J., LUO, G. S., DAÍ, Y. Y., 2005, "Functionalization of SBA-15 mesoporous silica with thiol or sulfonic groups under the crystallization conditions". *Microporous and Mesoporous Materials*, v. 84, p. 275-282.

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

ZANIN, G. M., 1989, *Sacarificação de amido em reator de leito fluidizado com enzima amiloglicosidase imobilizada*. Tese de doutorado. Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas.

ZANIN, G. M., MORAES, F. F., 1998, "Thermal Stability and Energy of Deactivation of Free and Immobilized Amyloglucosidase in the Saccharification of Liquefied Cassava Starch", *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 70-72, p. 383-394

ZANIN, G.M.; MORAES, F.F., 2014, *Enzimas Imobilizadas*. In: SAID, Suraia; PIETRO, Rosemeire Cristina Linhari Rodrigues. (Org.). *Enzimas como Agentes Biotecnológicos*. 2ed. Ribeirão Preto: Legis Summa, v.1, p.41-84.

ZHANG, Y.F., WU, H., LI, J., LI, L., JIANG, Y., JIANG, Z.Y., 2008, "Protamine-templated biomimetic hybrid capsules: efficient and stable carrier for enzyme encapsulation", *Chemistry of Materials*, v. 20, p. 1041-1048.

ZHOU, Q. Z. K., CHEN, X. D., 2001, "Effects of temperature and pH on the activity of immobilized β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*", *Biochemical Engineering Journal*, v. 9, p. 33-40.

ZYCHAR, B.C., OLIVEIRA, B.A., 2017, "Fatores desencadeantes da Intolerância à Lactose: Metabolismo Enzimático, Diagnóstico e Tratamento", *Atas de Ciências da Saúde*, v.5, n.1, p. 35-46.

8. CAPÍTULO VIII - ANEXO

Neste capítulo mostram-se os resultados dos ensaios da atividade enzimática em função do pH e da temperatura, e da estabilidade térmica da enzima. Estão representadas aqui as curvas de concentração de evolução da atividade residual da enzima solúvel e dos biocatalisadores imobilizados. Também estão anexados os artigos a serem publicados em periódicos.

8.1 Gráficos e Equações da Influência do pH e da Temperatura na Atividade da Enzima Solúvel

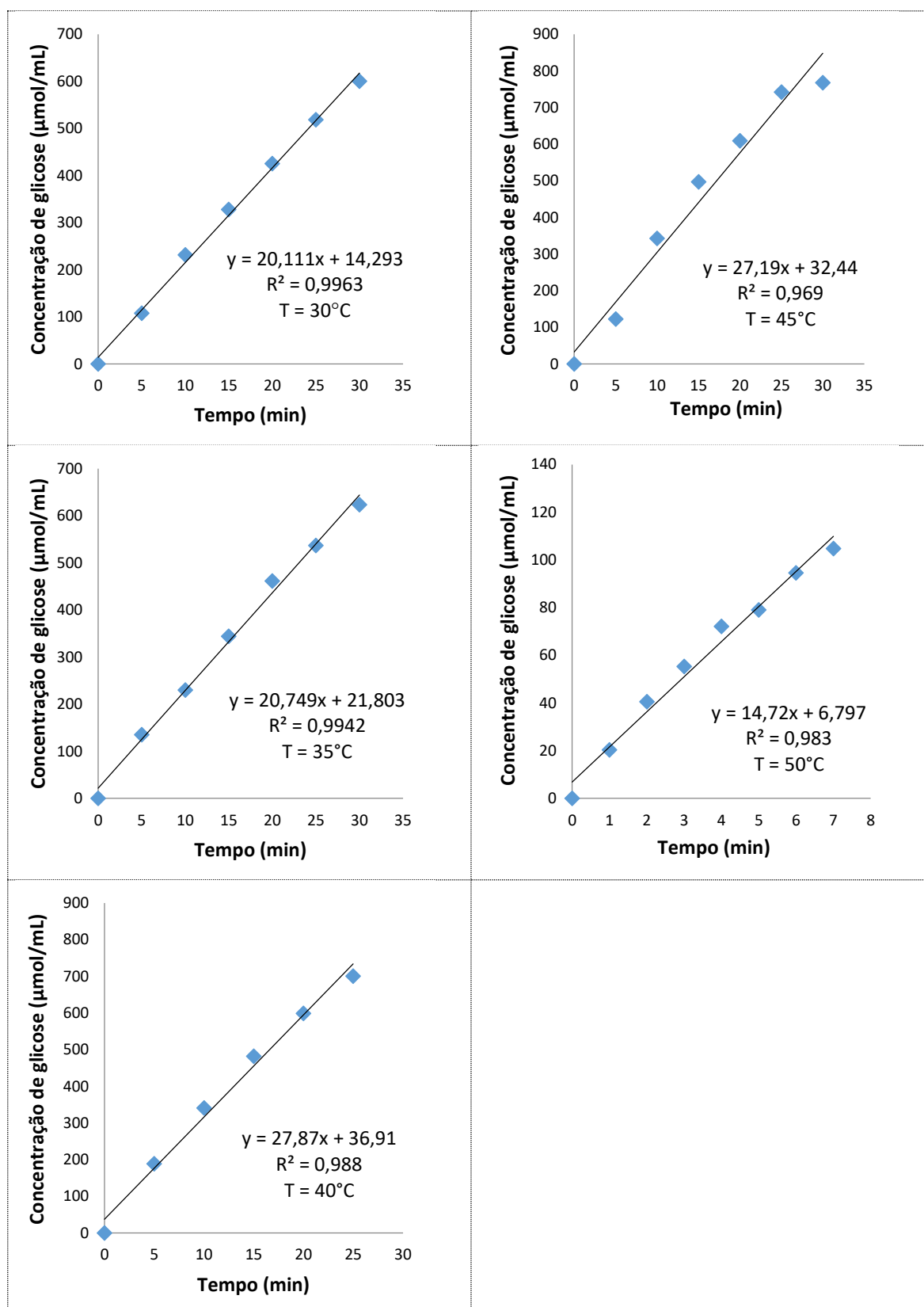


Figura 8.1 - Concentração da glicose em função do tempo de reação em solução de lactose 5 % (m/v) em soro de leite e pH 6,0, a diferentes temperaturas.

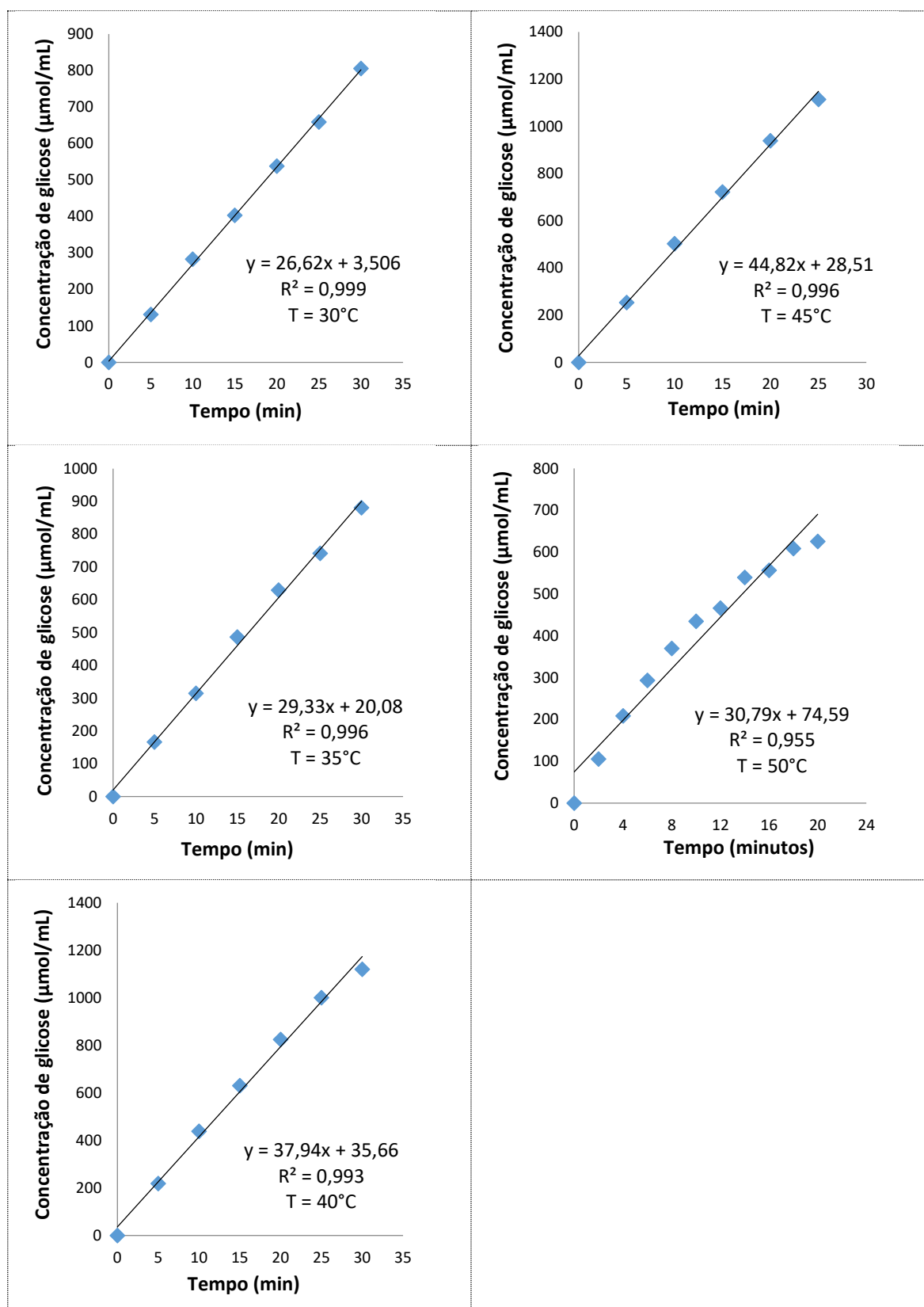


Figura 8.2 - Concentração da glicose em função do tempo de reação em solução de lactose 5 % (m/v) em soro de leite e pH 6,5, a diferentes temperaturas.

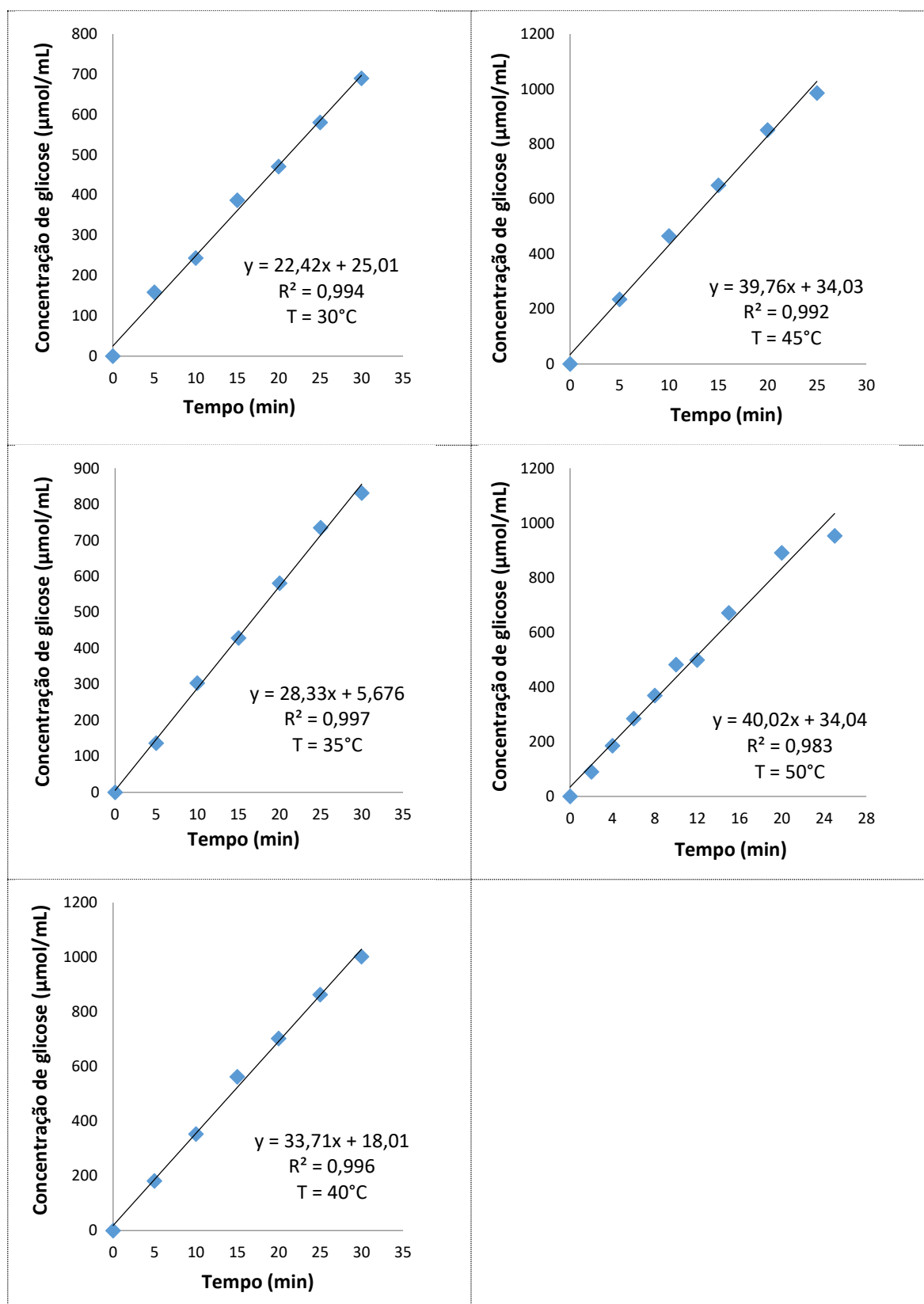


Figura 8.3 - Concentração da glicose em função do tempo de reação em solução de lactose 5 % (m/v) em soro de leite e pH 7,0, a diferentes temperaturas.

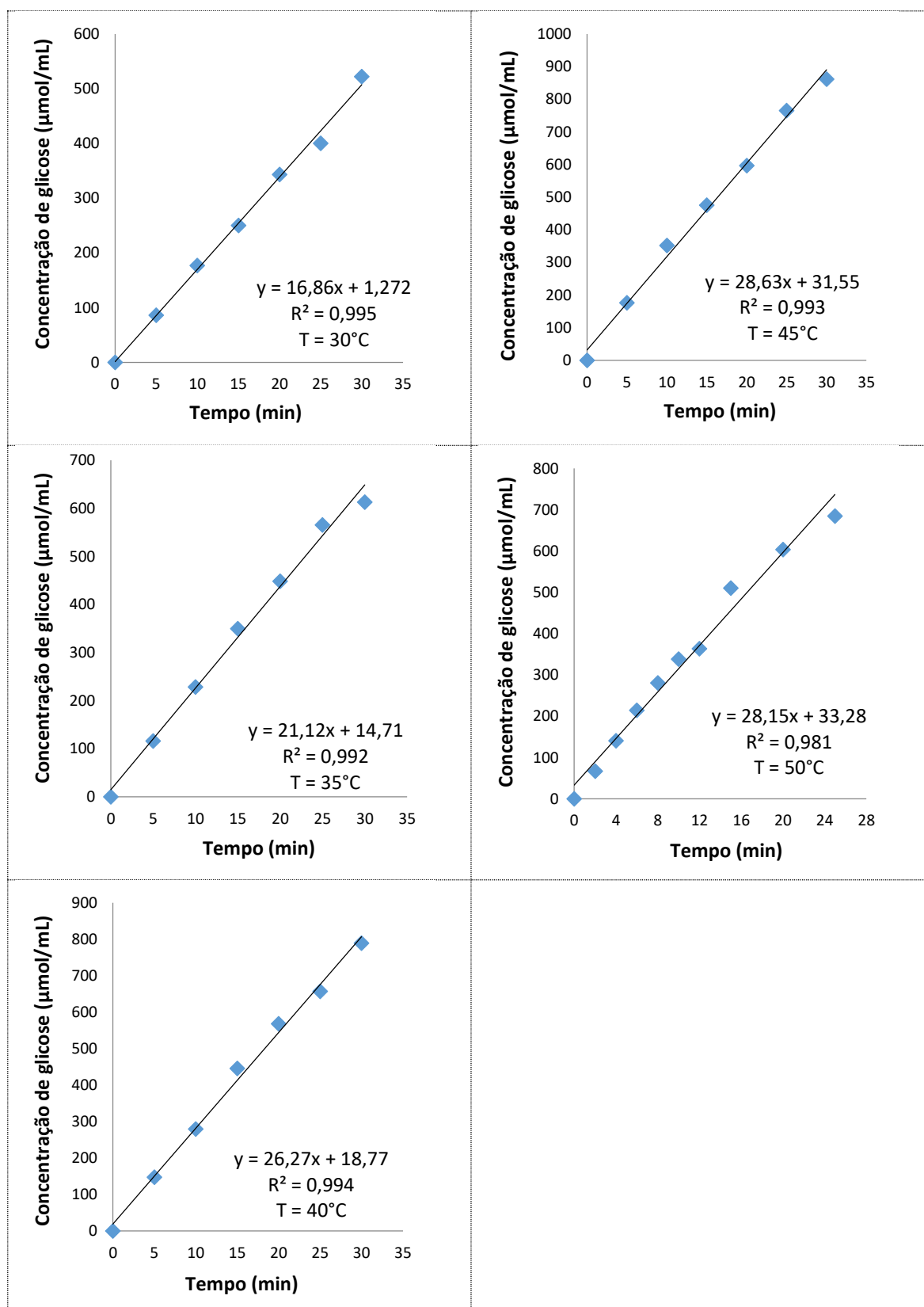
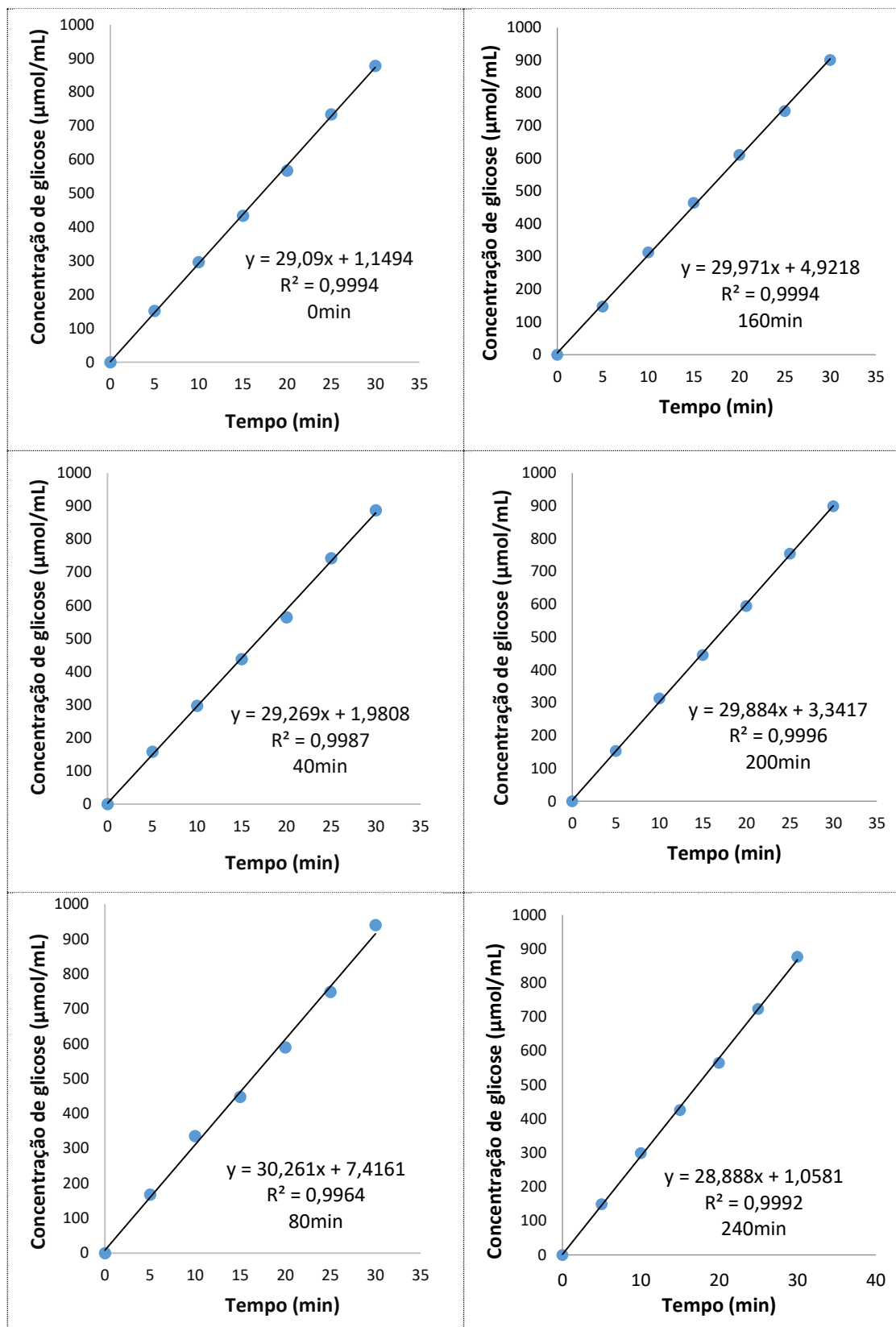


Figura 8.4 - Concentração da glicose em função do tempo de reação em solução de lactose 5 % (m/v) em soro de leite e pH 7,5, a diferentes temperaturas.

8.2 Gráficos do ensaio de estabilidade térmica para a enzima solúvel (lactose 5 % (m/v) e pH 6,5)



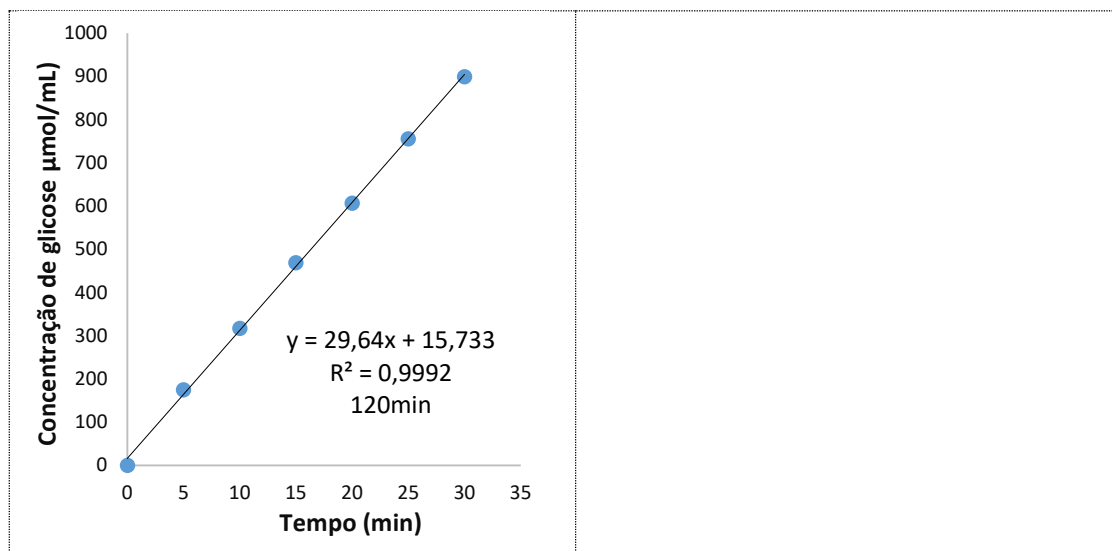
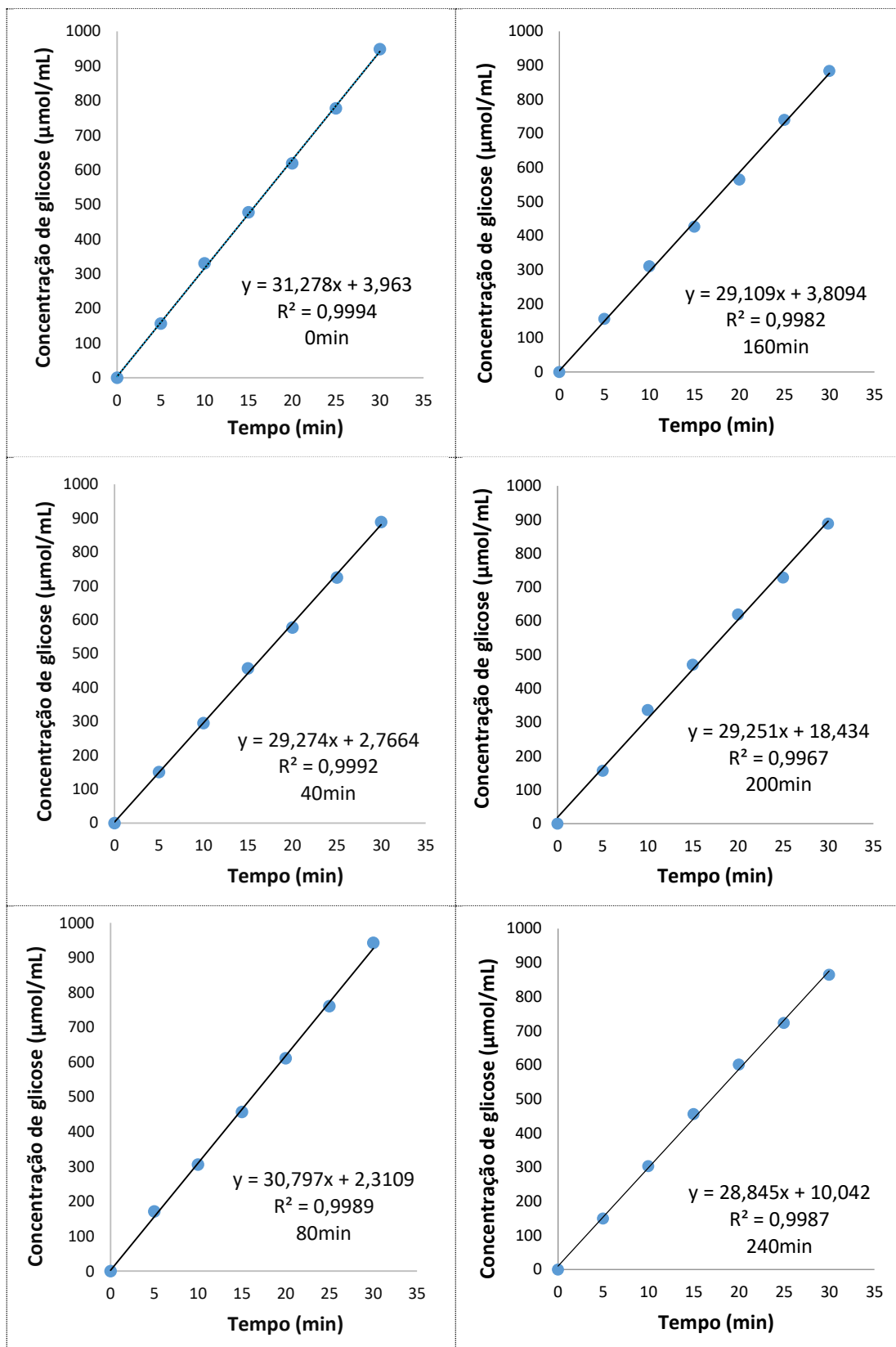


Figura 8.5 - Concentração da glicose em função do tempo de reação em solução de lactose 5 % (m/v) em soro de leite na temperatura de 30°C.



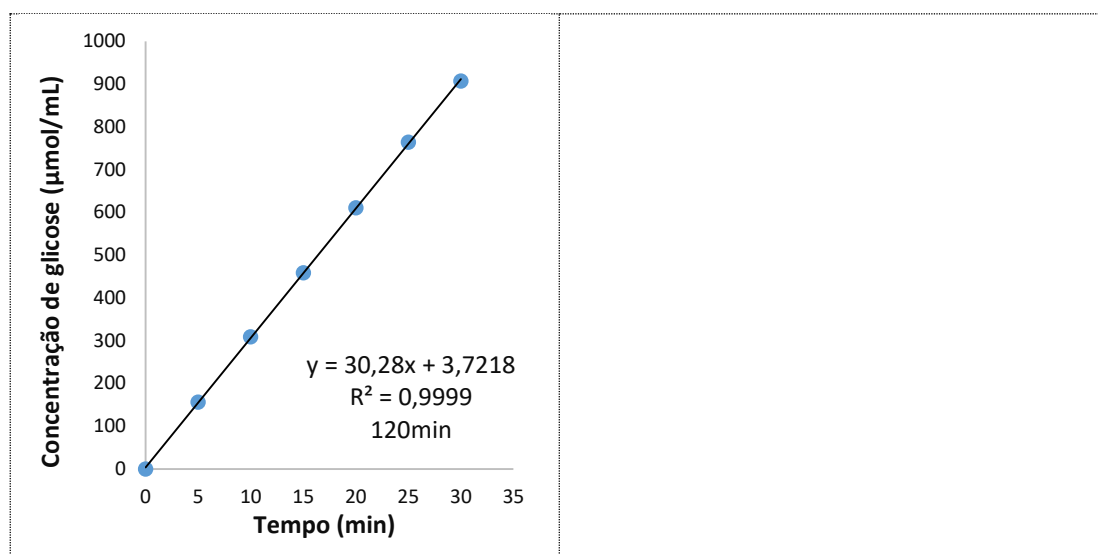
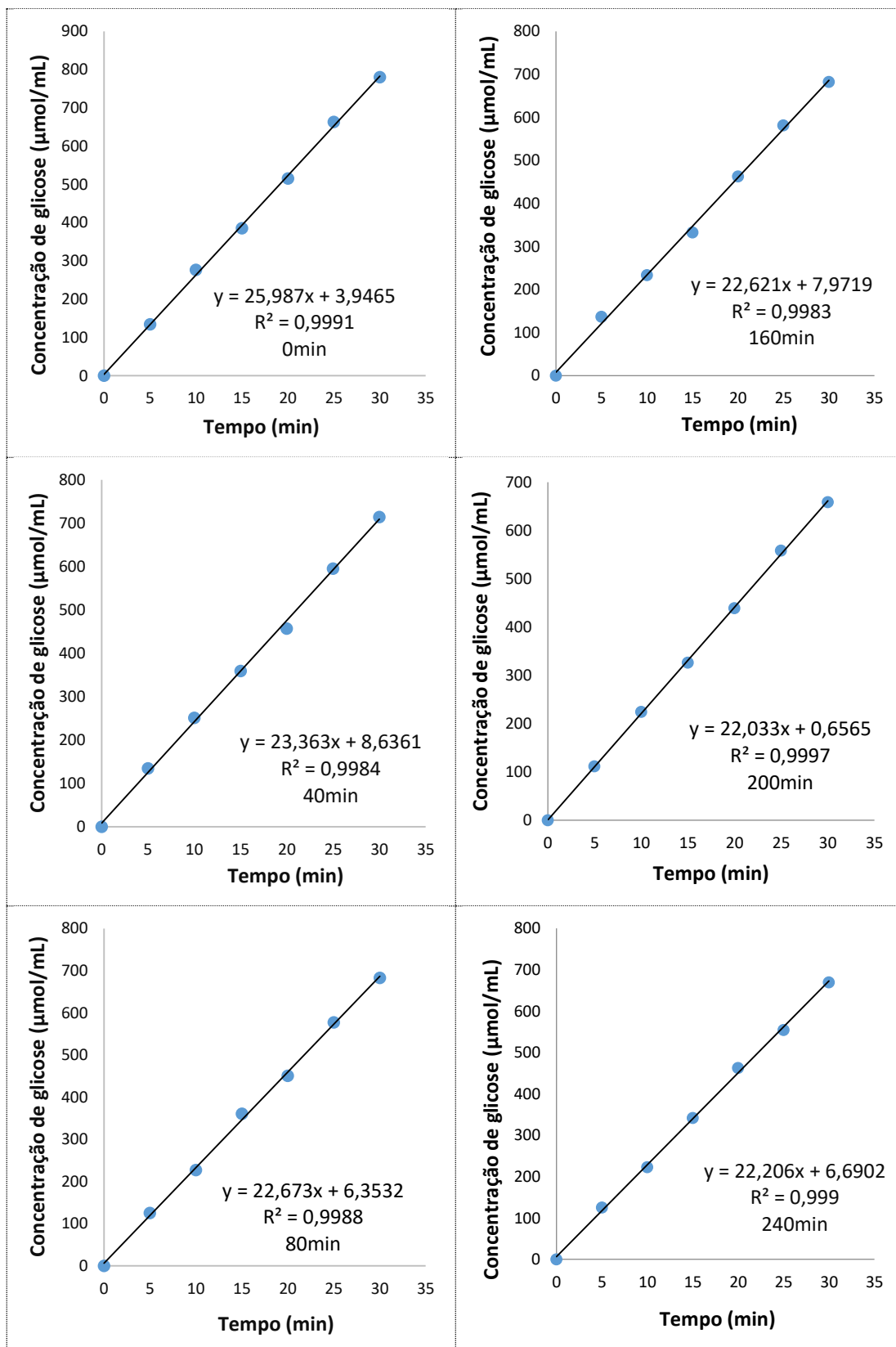


Figura 8.6 - Concentração da glicose em função do tempo de reação em solução de lactose 5 % (m/v) em soro de leite na temperatura de 35°C.



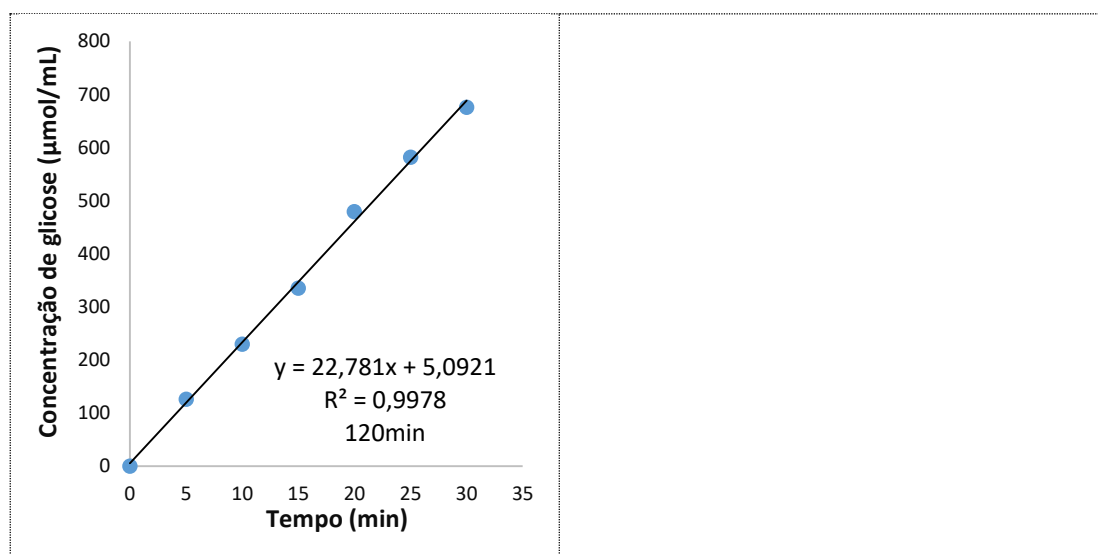
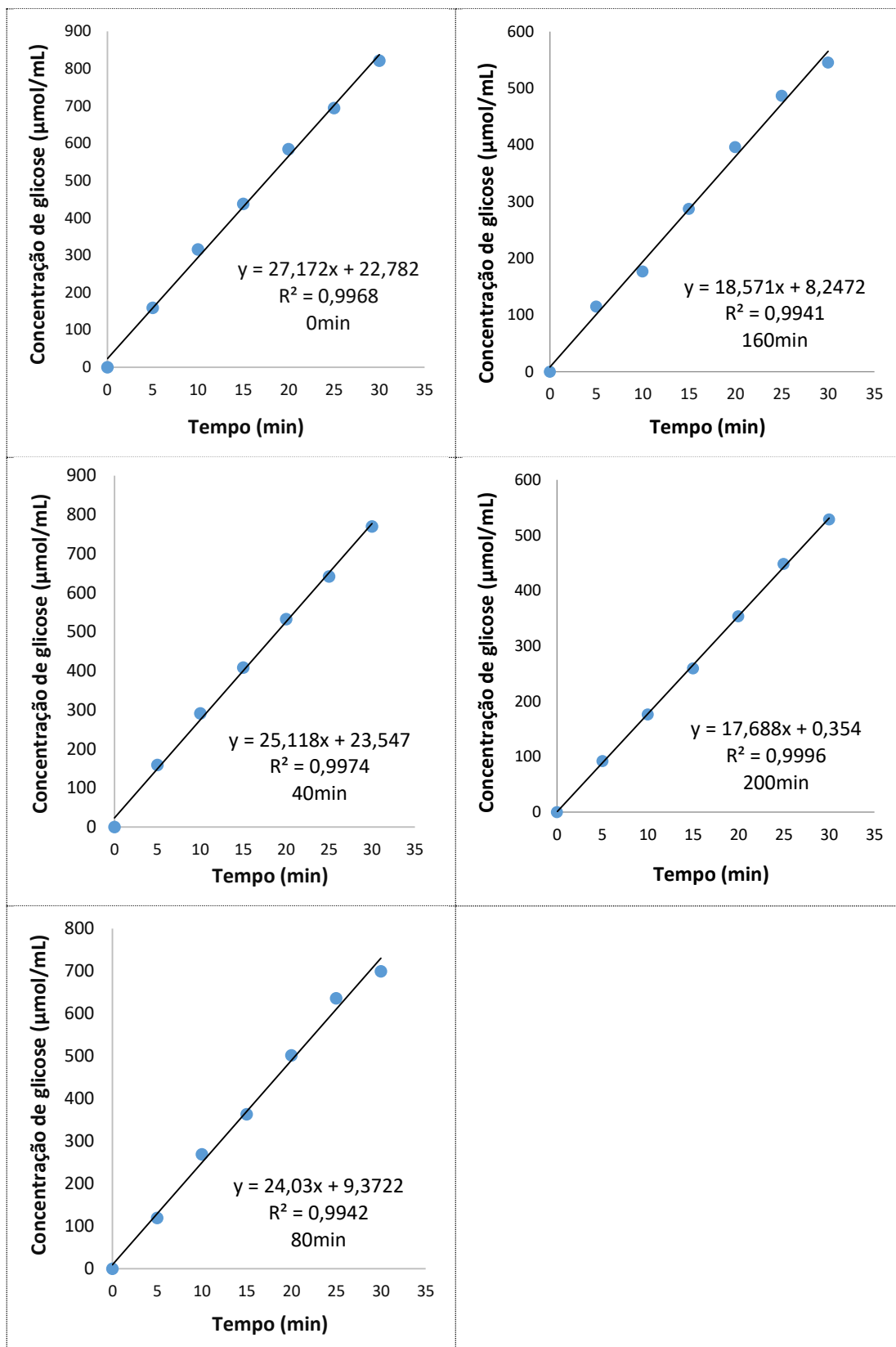


Figura 8.7 - Concentração da glicose em função do tempo de reação em solução de lactose 5 % (m/v) em soro de leite na temperatura de 40°C.



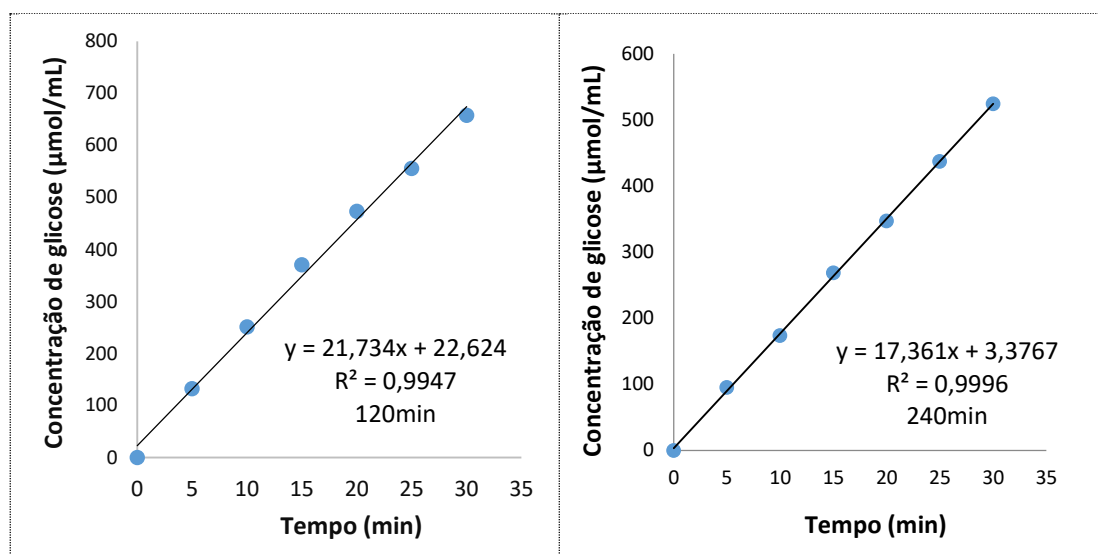
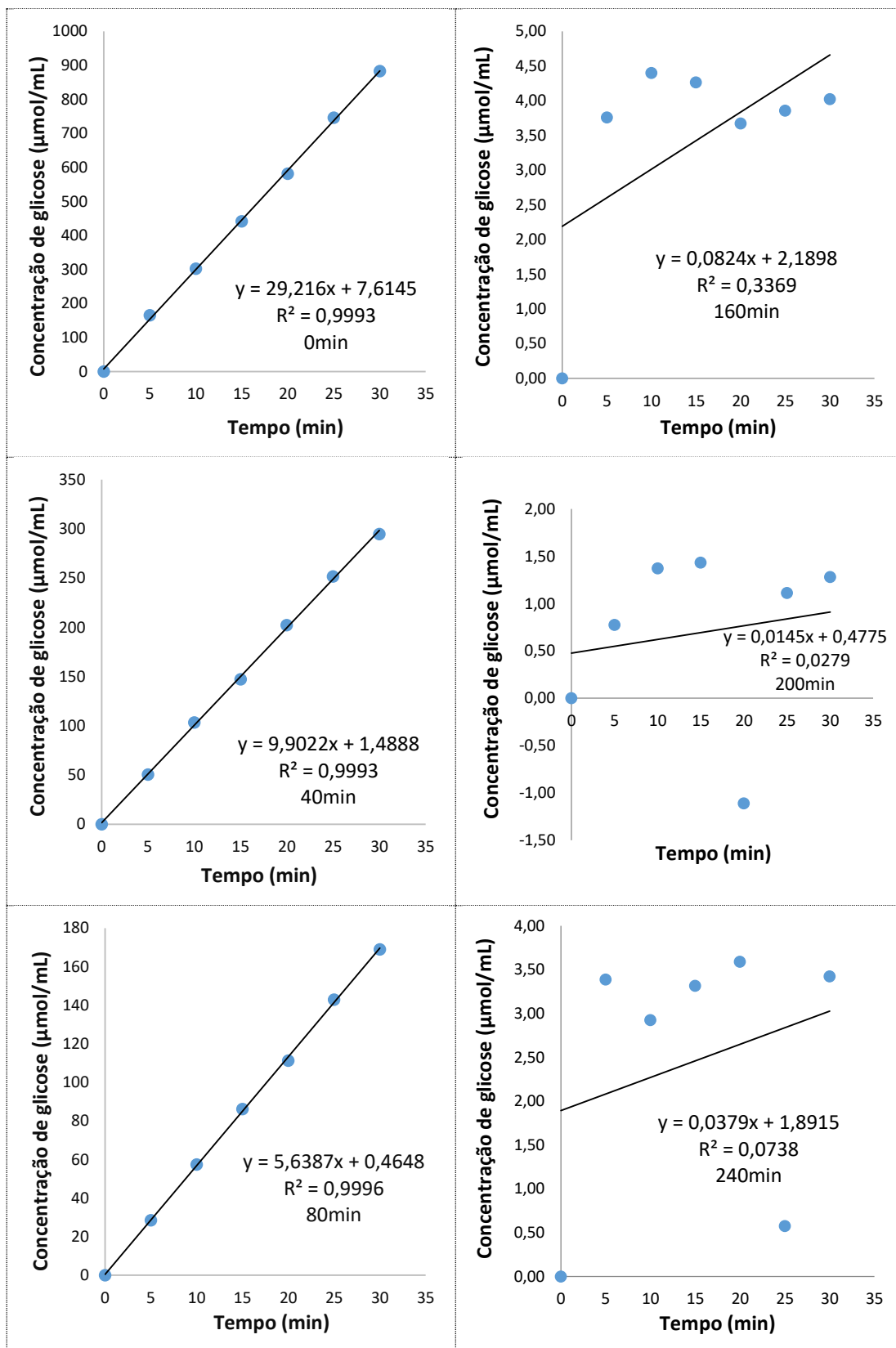


Figura 8.8 - Concentração da glicose em função do tempo de reação em solução de lactose 5 % (m/v) em soro de leite na temperatura de 45°C.



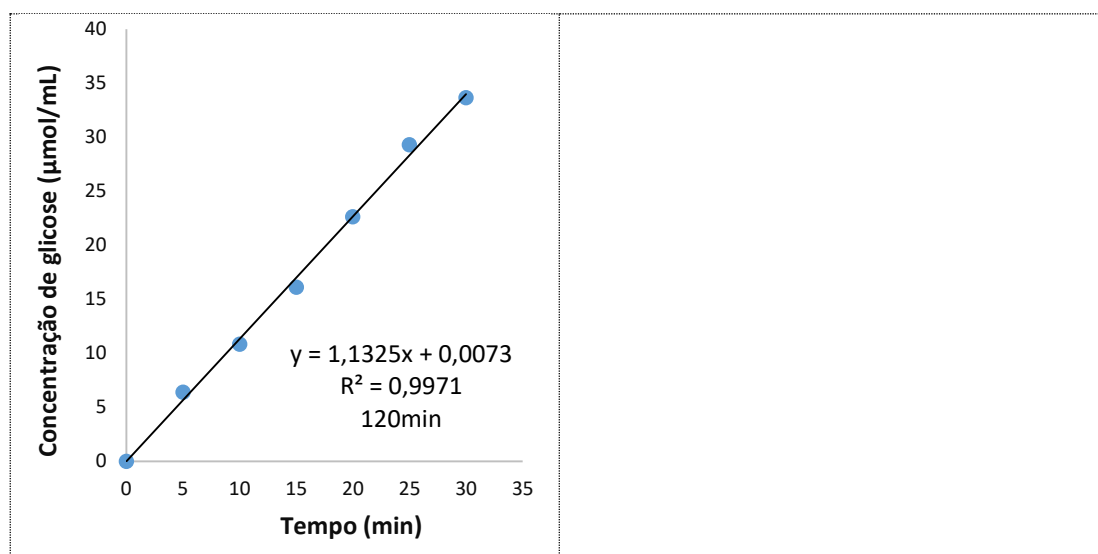


Figura 8.9 - Concentração da glicose em função do tempo de reação em solução de lactose 5 % (m/v) em soro de leite na temperatura de 50°C.

8.3 Gráficos e Equações da Influência do pH e da Temperatura na Atividade da Enzima Imobilizada

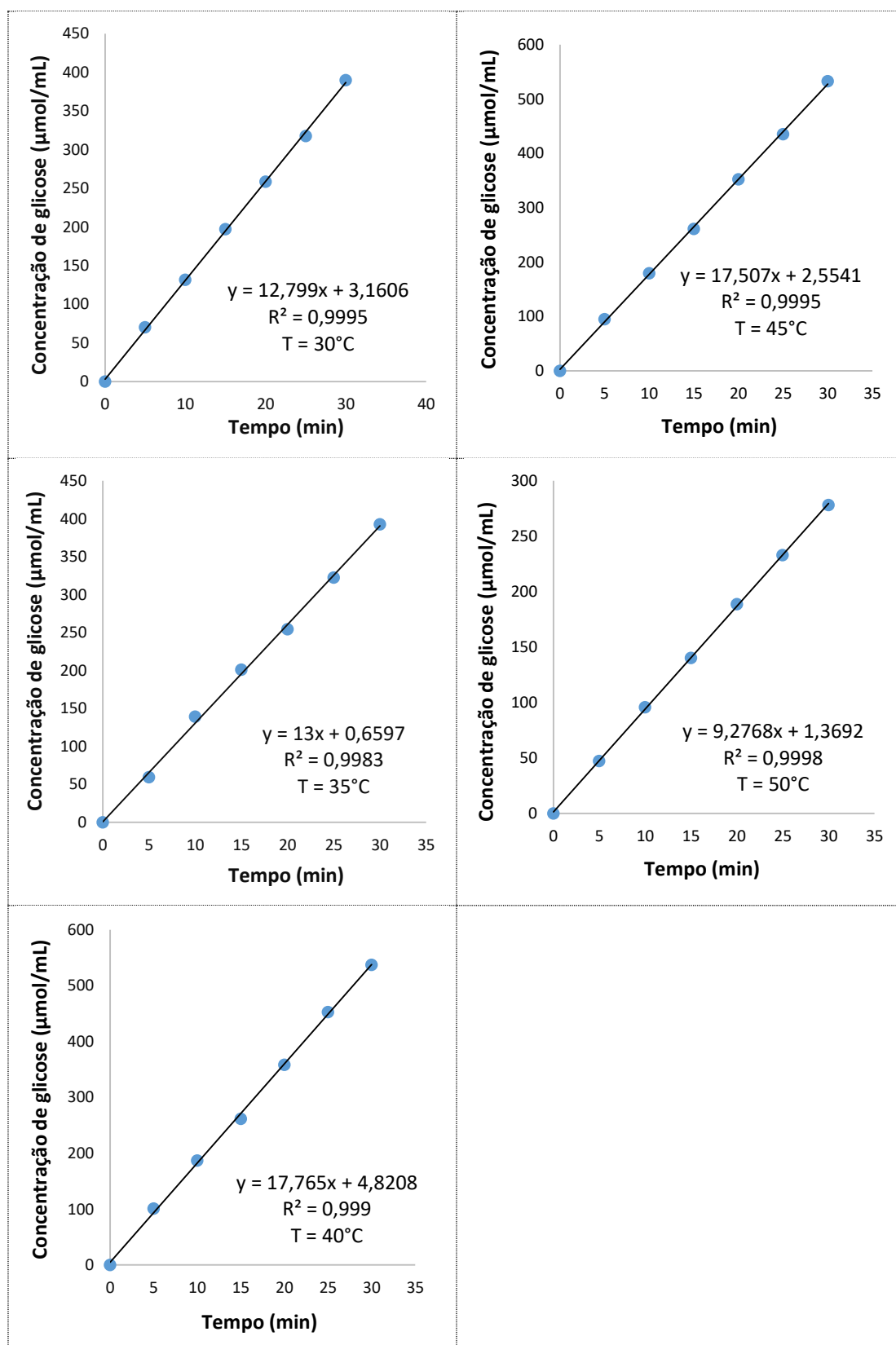


Figura 8.10 - Concentração da glicose em função do tempo de reação em solução de lactose 5 % (m/v) em soro de leite e pH 6,0; a diferentes temperaturas.

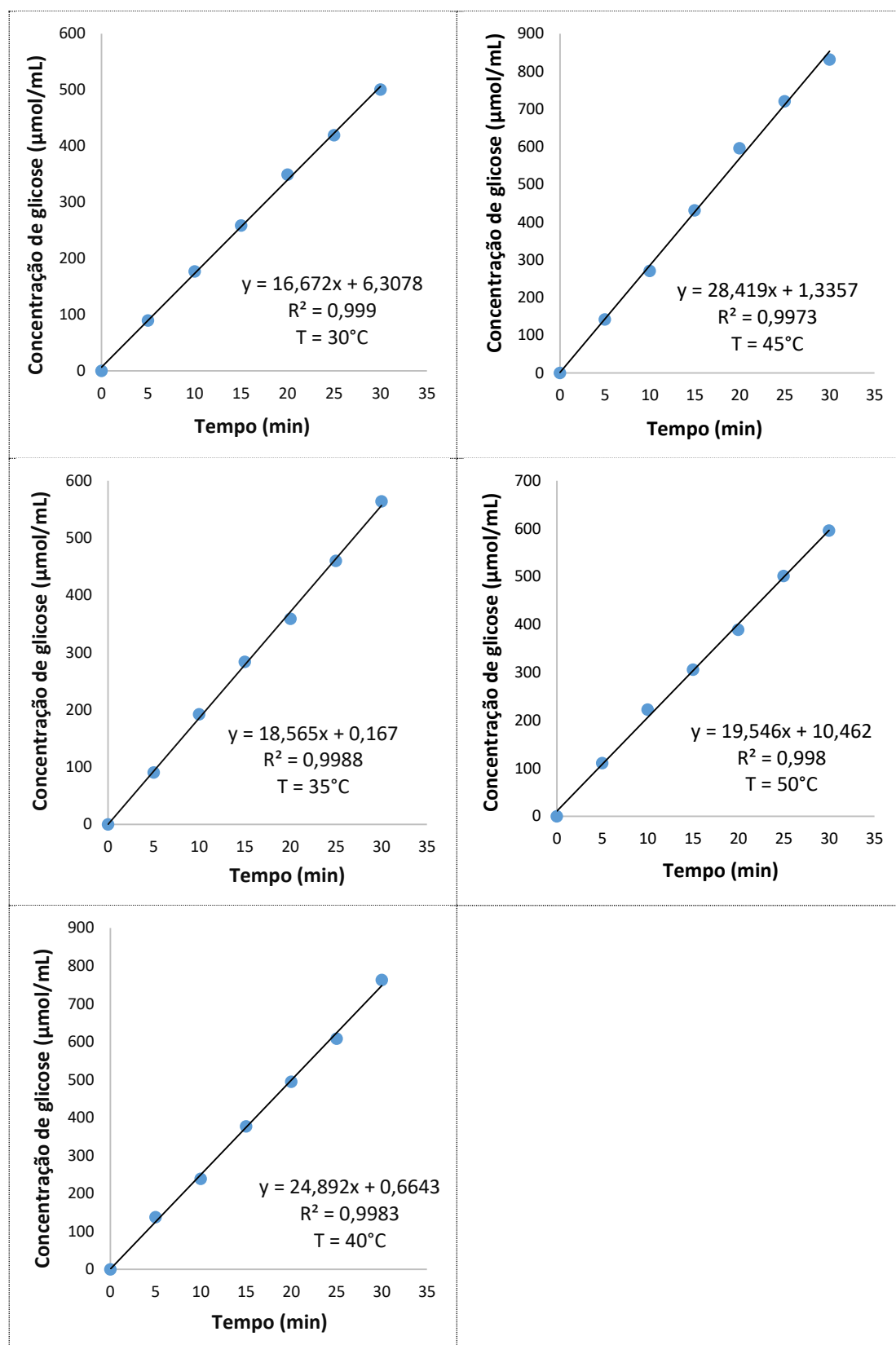


Figura 8.11 - Concentração da glicose em função do tempo de reação em solução de lactose 5 % (m/v) em soro de leite e pH 6,5; a diferentes temperaturas.

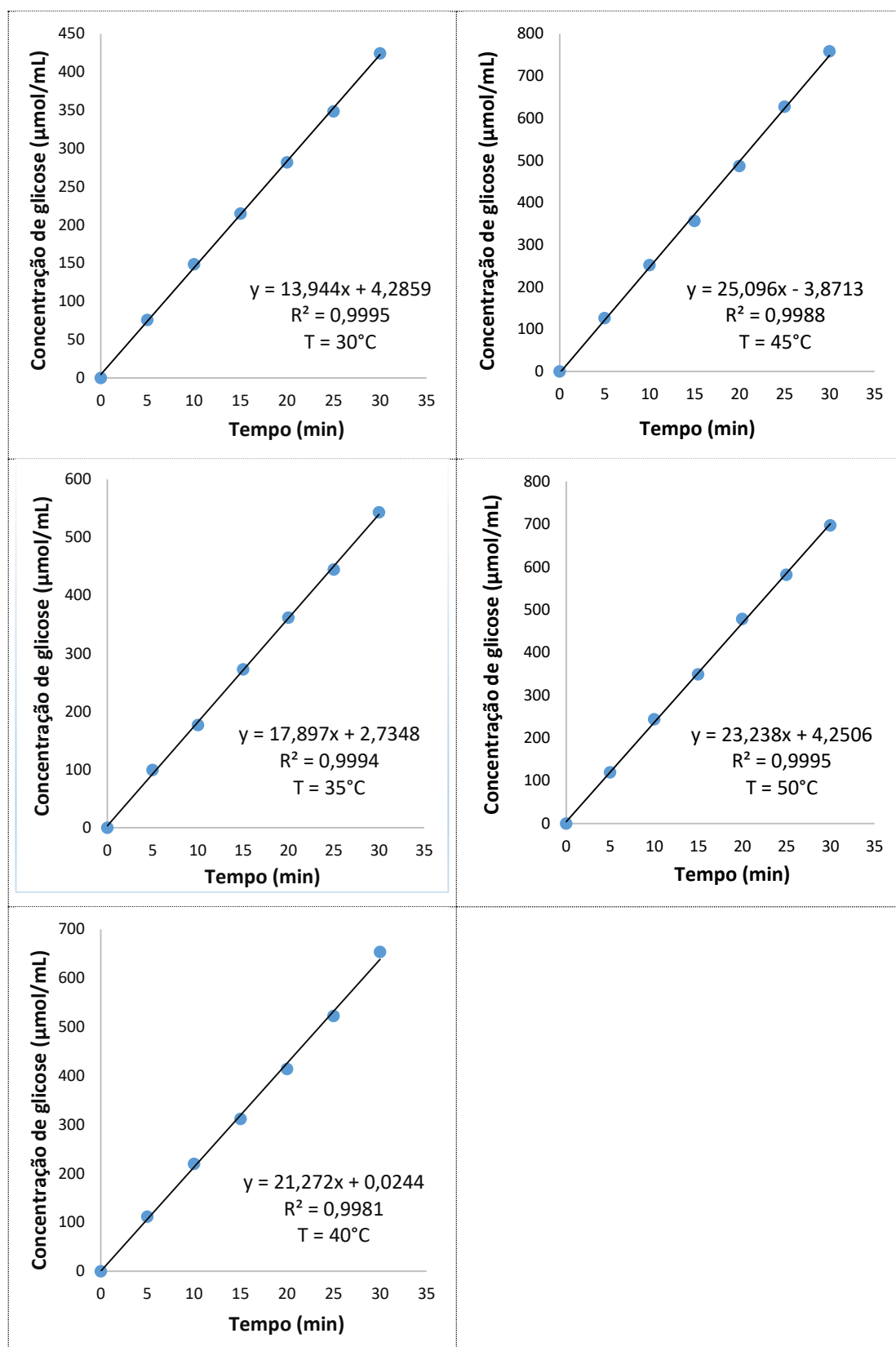


Figura 8.12 - Concentração da glicose em função do tempo de reação em solução de lactose 5 % (m/v) em soro de leite e pH 7,0; a diferentes temperaturas.

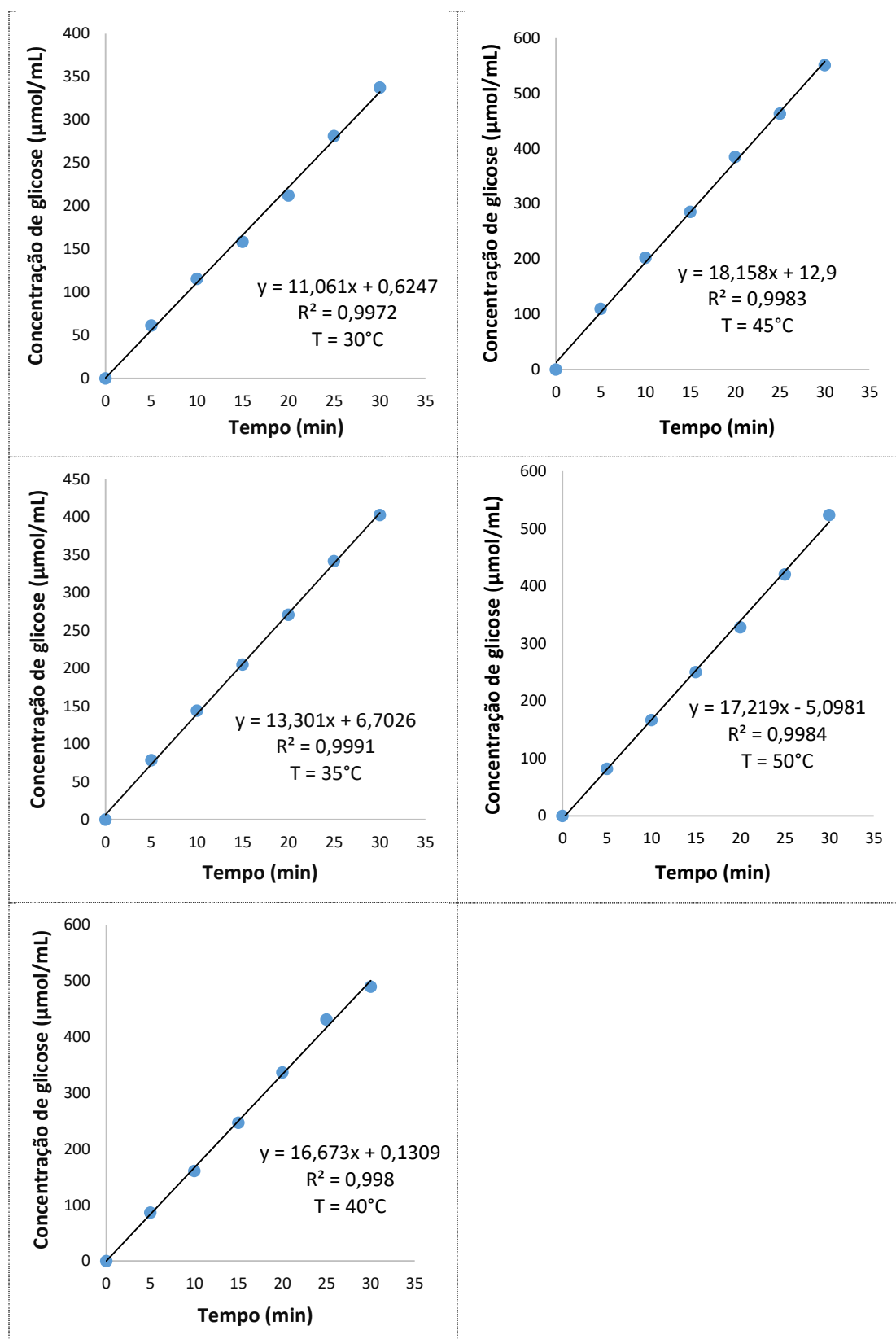
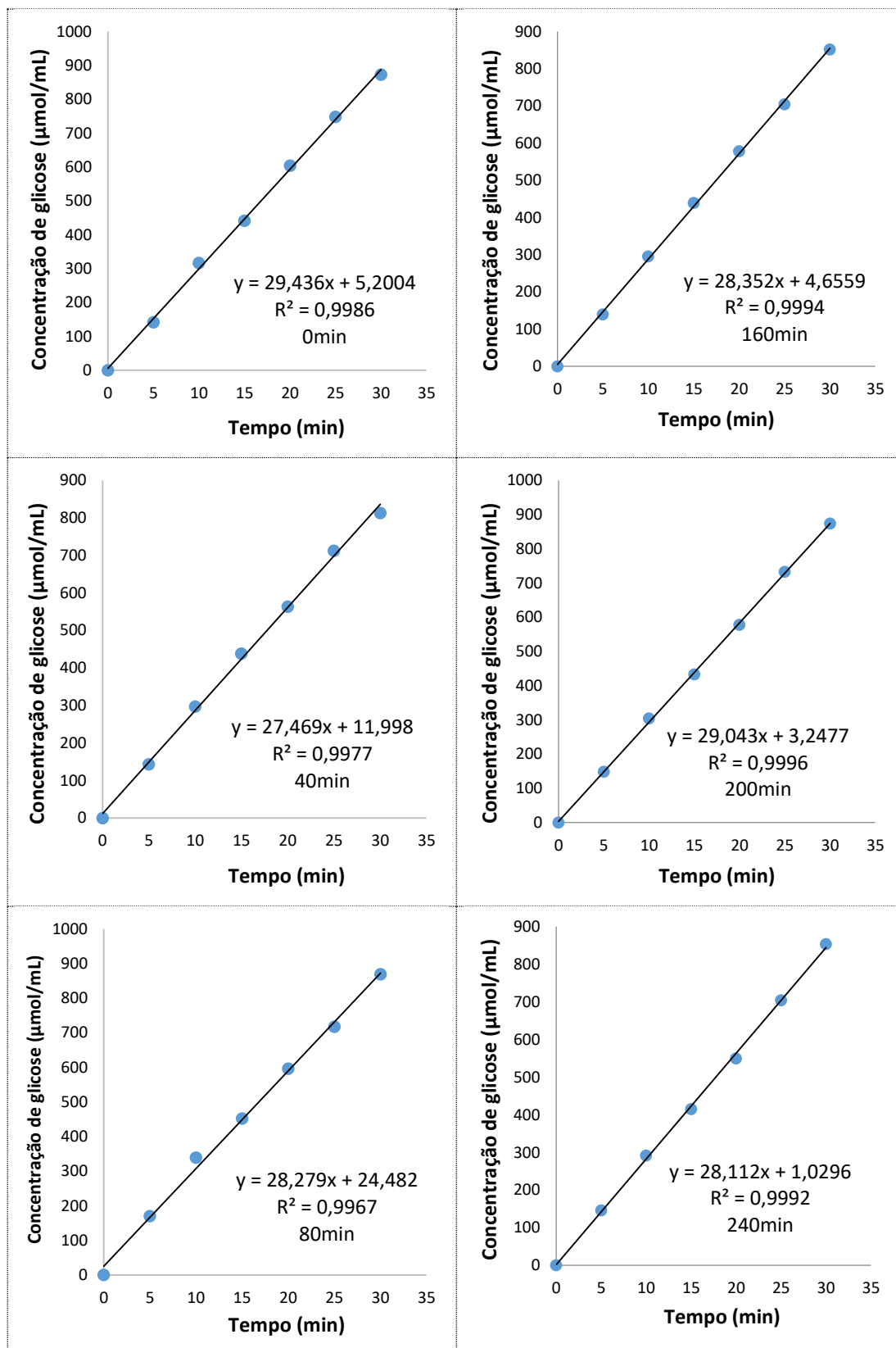


Figura 8.13 - Concentração da glicose em função do tempo de reação em solução de lactose 5 % (m/v) em soro de leite e pH 7,5; a diferentes temperaturas.

8.4 Gráficos do Ensaio de Estabilidade Térmica para a Enzima Imobilizada (lactose 5 % (m/v) em soro de leite e pH 6,5)



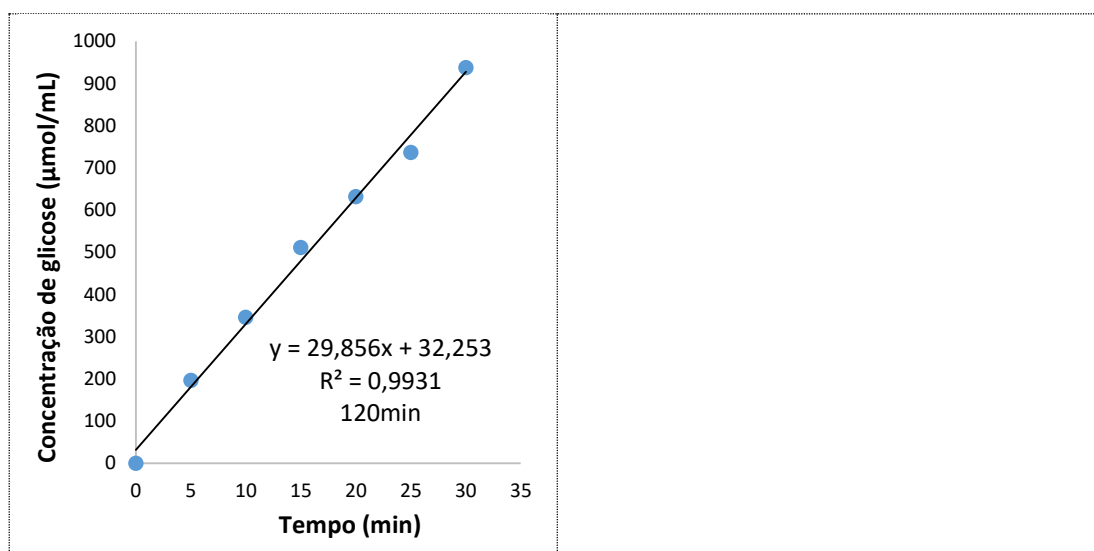
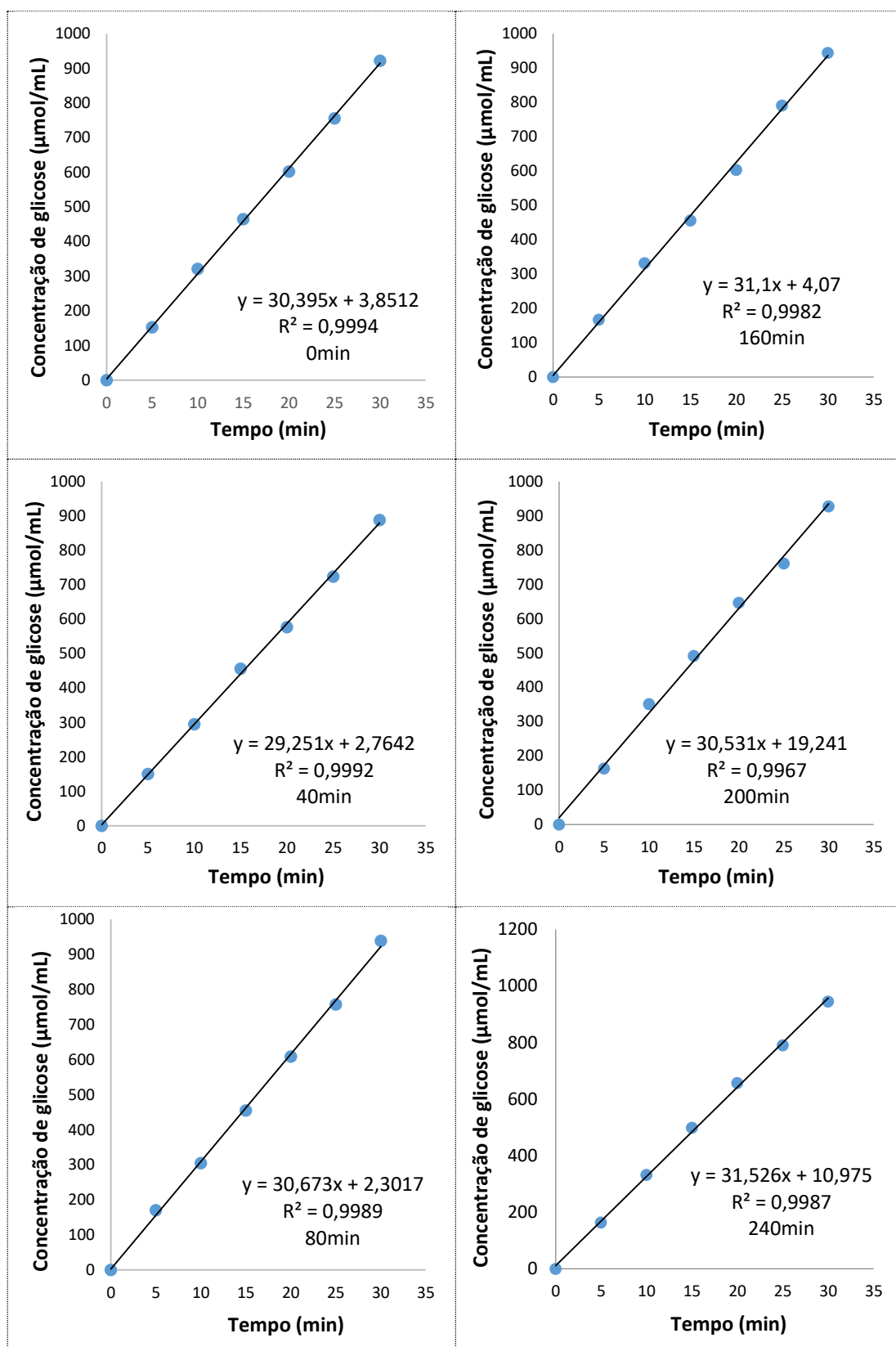


Figura 8.14 - Concentração da glicose em função do tempo de reação em solução de lactose 5 % (m/v) em soro de leite na temperatura de 30°C.



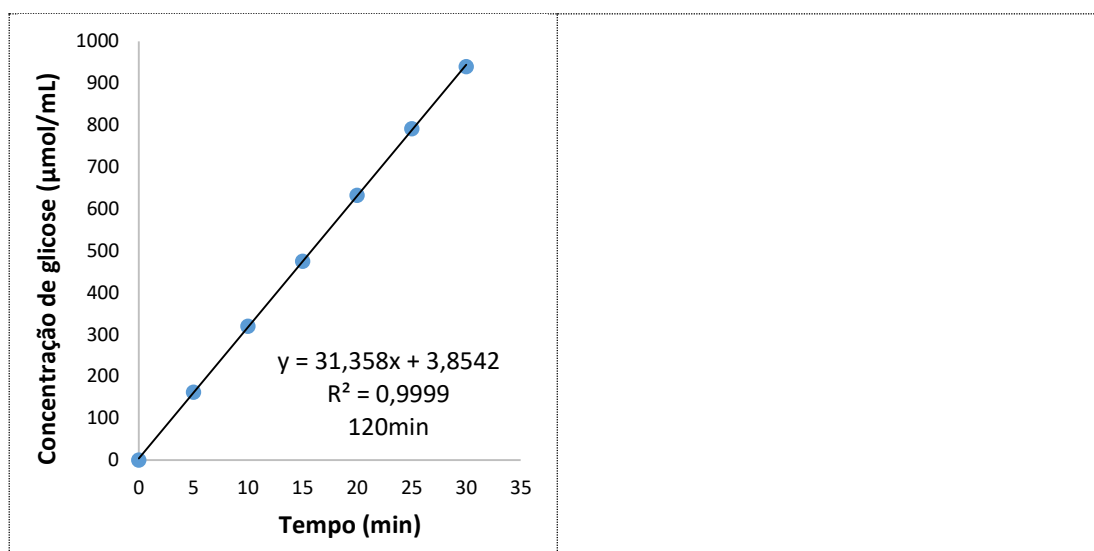
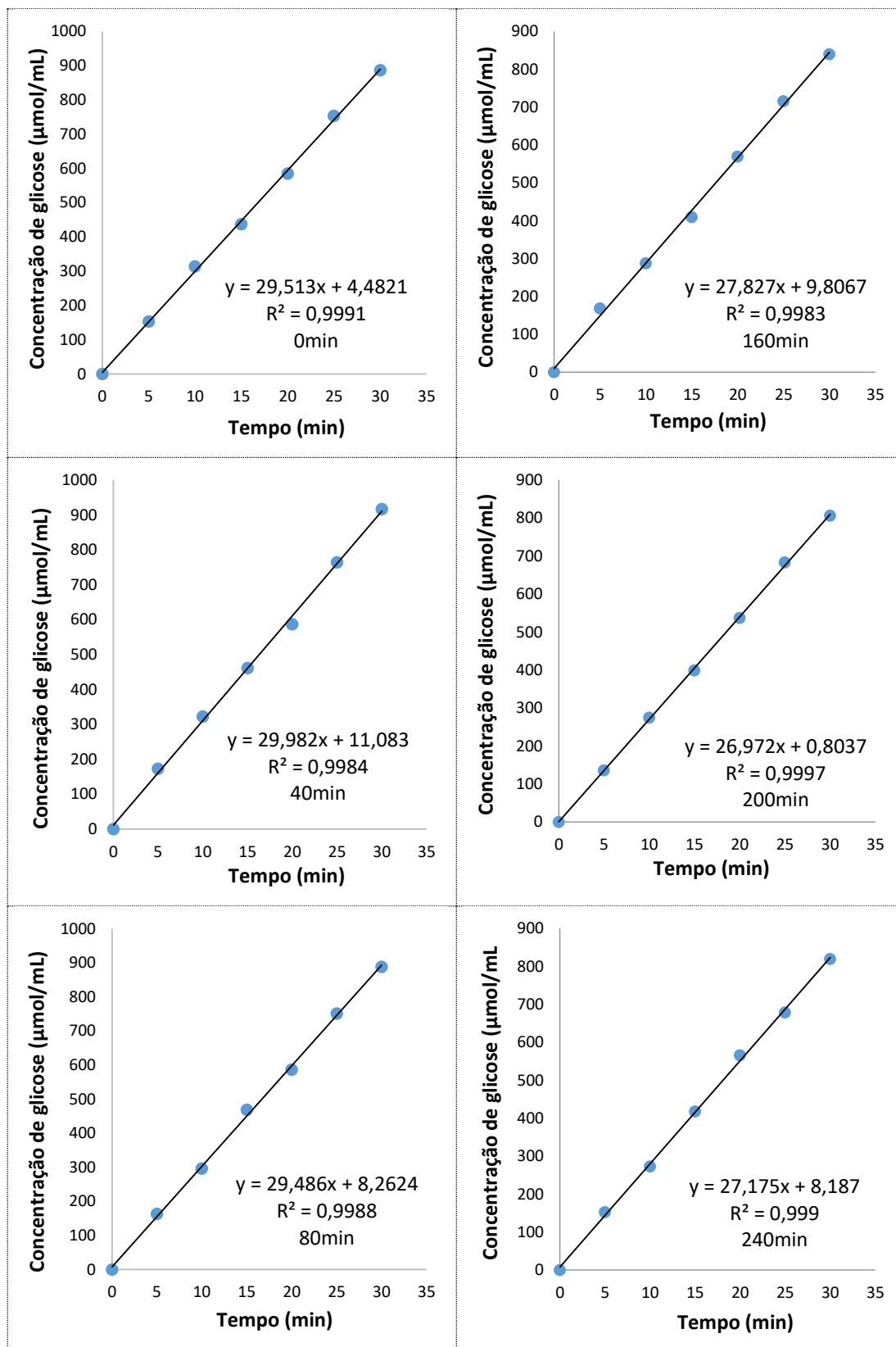


Figura 8.15 - Concentração da glicose em função do tempo de reação em solução de lactose 5 % (m/v) em soro de leite na temperatura de 35°C.



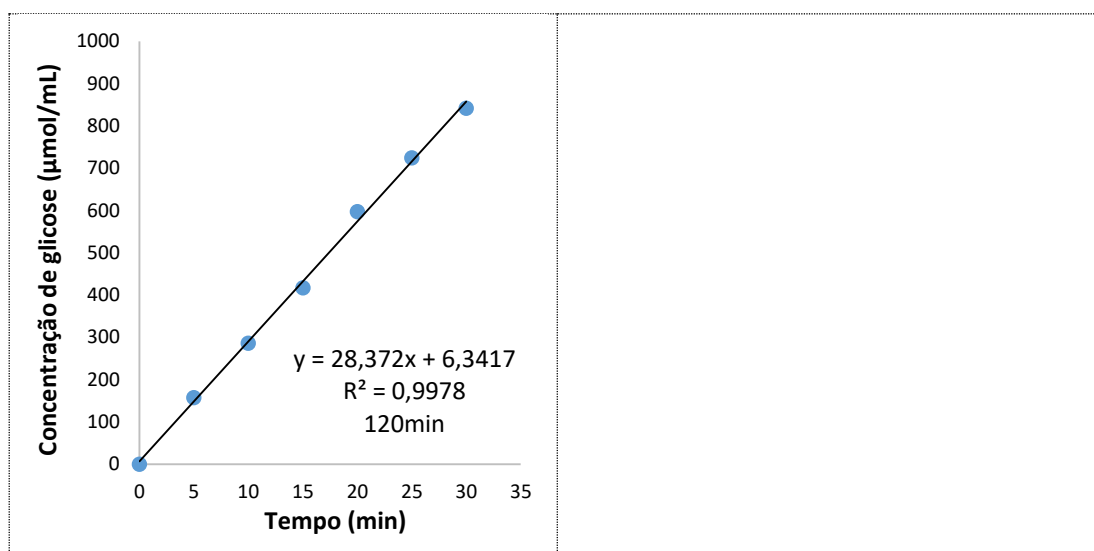
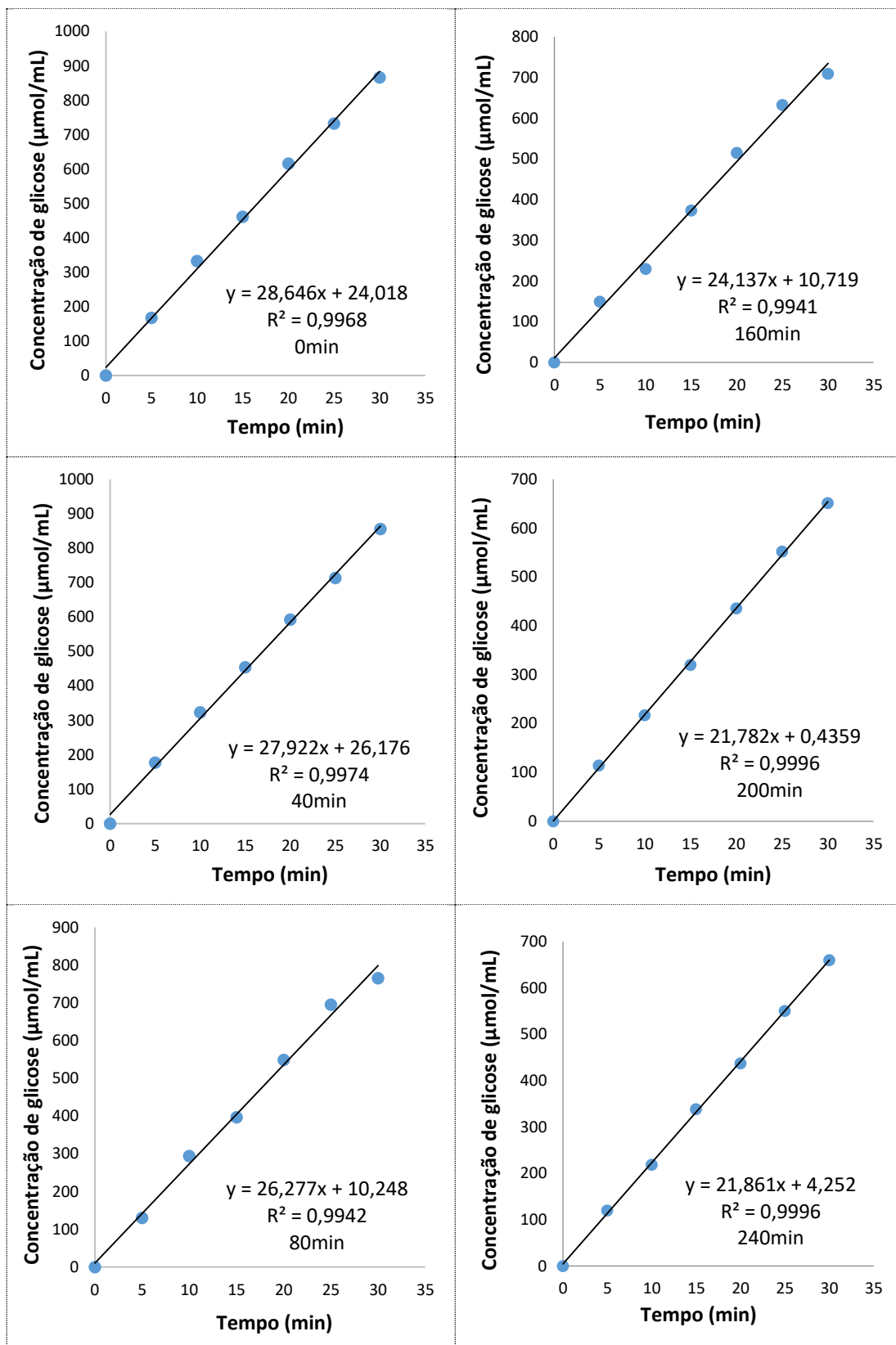


Figura 8.16 - Concentração da glicose em função do tempo de reação em solução de lactose 5 % (m/v) em soro de leite na temperatura de 40°C.



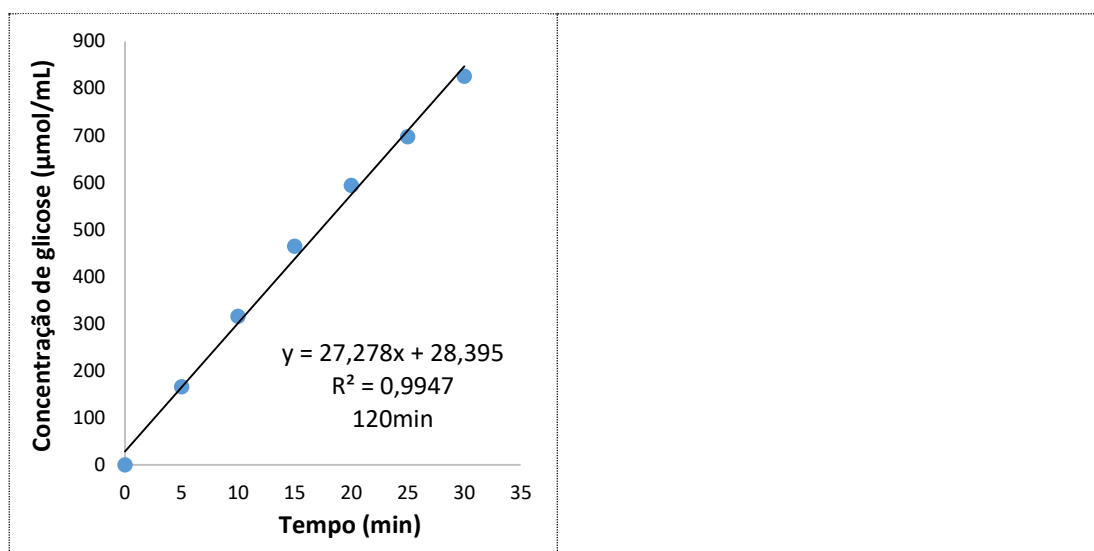
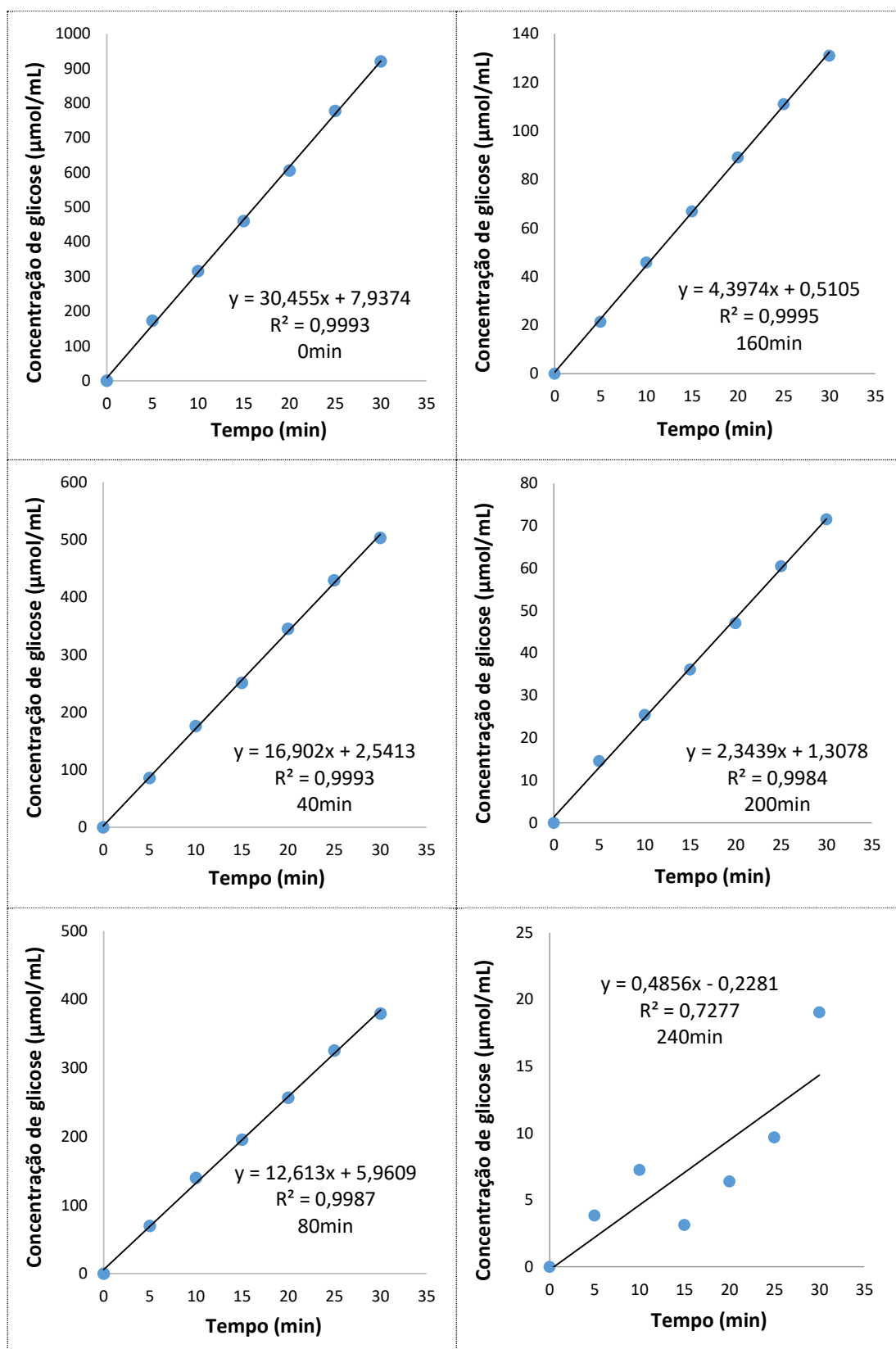


Figura 8.17 - Concentração da glicose em função do tempo de reação em solução de lactose 5 % (m/v) em soro de leite na temperatura de 45°C.



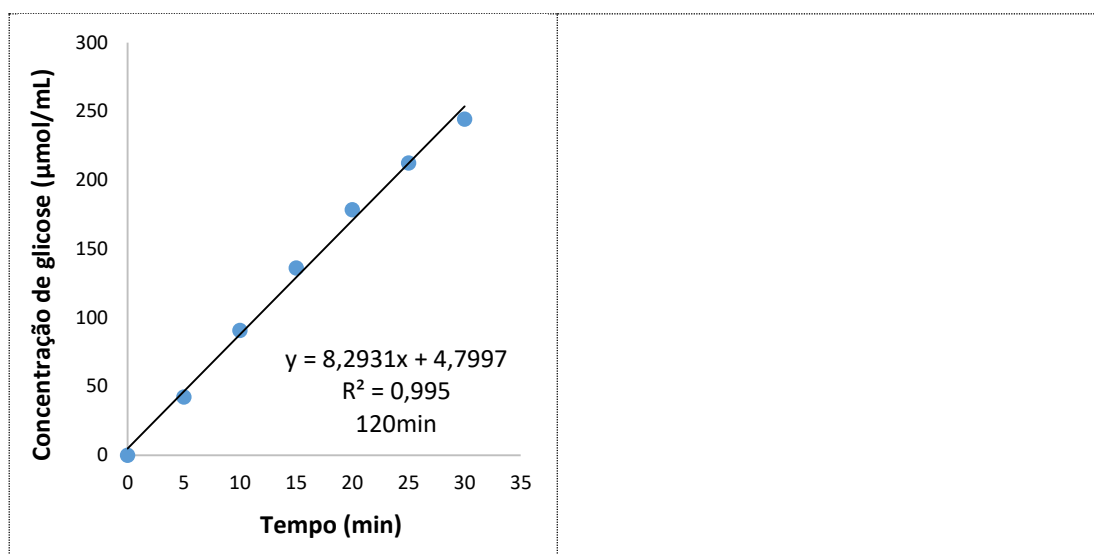


Figura 8.18 - Concentração da glicose em função do tempo de reação em solução de lactose 5 % (m/v) em soro de leite na temperatura de 50°C.

8.5 Curvas de Evolução da Atividade Residual em Função do Tempo de Incubação (para o Cálculo de K_d)

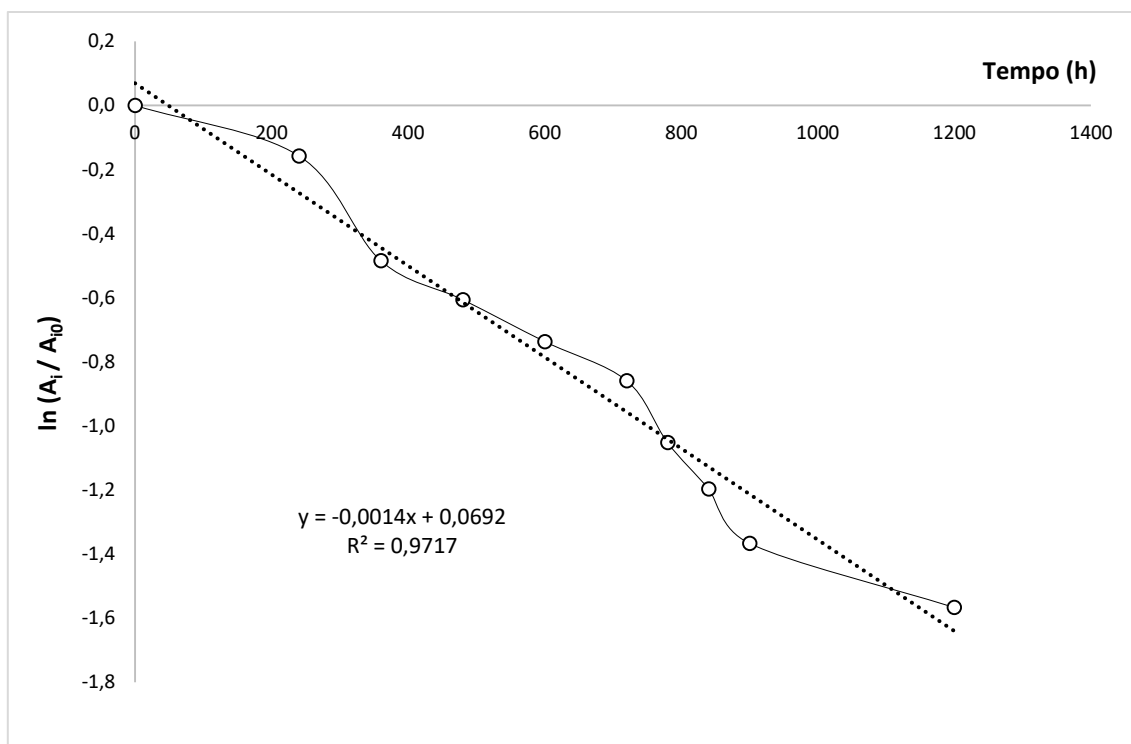


Figura 8.19 - Evolução da atividade residual da enzima β -galactosidase solúvel em função do tempo de incubação em diferentes temperaturas.

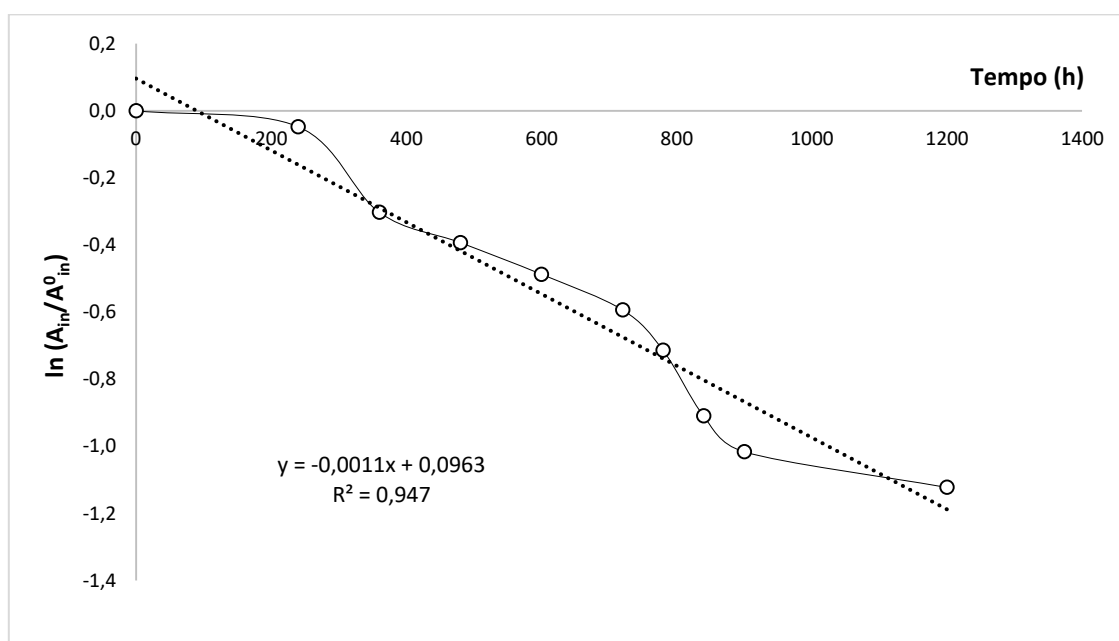


Figura 8.20 - Evolução da atividade residual da enzima β -galactosidase immobilizada sem reticulação com glutaraldeído em função do tempo de incubação em diferentes temperaturas.

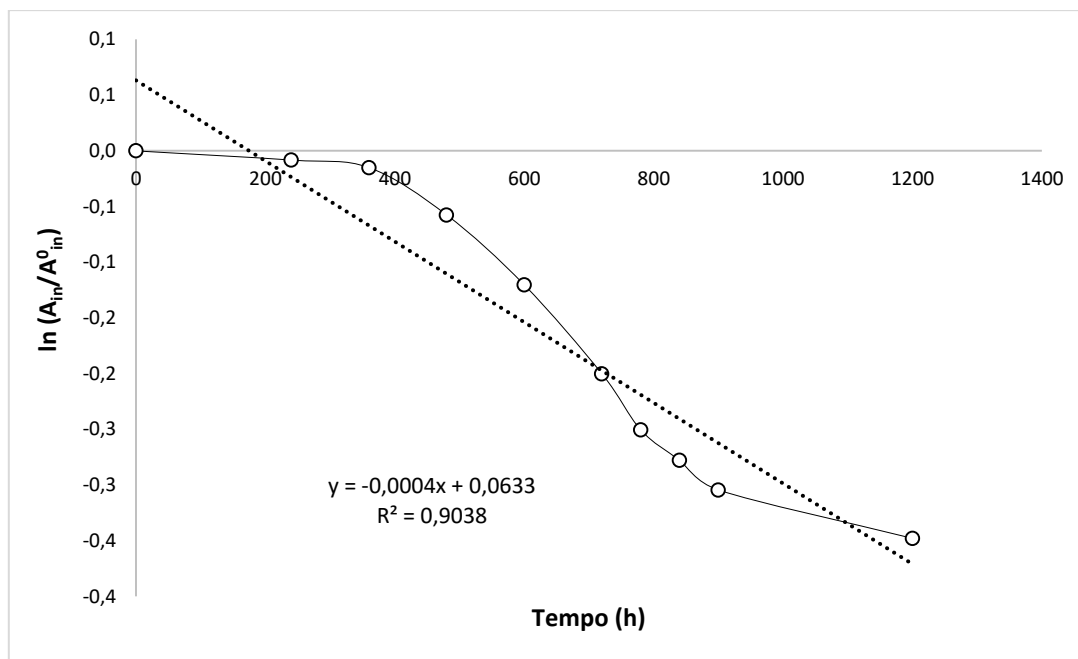


Figura 8.21 - Evolução da atividade residual da enzima β -galactosidase immobilizada com reticulação com glutaraldeído em função do tempo de incubação em diferentes temperaturas.