



UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

MAYKON JHULY MARTINS DE PAIVA

**ENCAPSULAÇÃO DE  $\beta$ -GALACTOSIDASE EM CO-  
POLÍMERO ALGINATO-PECTINA E HIDRÓLISE DE SORO  
DE LEITE E LEITE INTEGRAL**

PALMAS

2019

MAYKON JHULY MARTINS DE PAIVA

**ENCAPSULAÇÃO DE  $\beta$ -GALACTOSIDASE EM CO-  
POLÍMERO ALGINATO-PECTINA E HIDRÓLISE DE SORO  
DE LEITE E LEITE INTEGRAL**

Dissertação apresentada à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Tocantins, para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

**Orientador:** Prof.Dr.Alex Fernando de Almeida

**Co-orientador:** Prof. Dr Fabricio de Paula Coutinho

**Linha de pesquisa:** Biotecnologia Aplicada à Indústria de Alimentos

PALMAS

2019

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**  
**Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Tocantins**

---

P149e PAIVA, MAYKON JHULY MARTINS DE.  
ENCAPSULAÇÃO DE  $\beta$ -GALACTOSIDASE EM COPOLÍMERO  
ALGINATO-PECTINA E HIDRÓLISE DE SORO DE LEITE E LEITE  
INTEGRAL. / MAYKON JHULY MARTINS DE PAIVA. – Palmas, TO, 2019.  
54 f.

Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade Federal do Tocantins  
– Câmpus Universitário de Palmas - Curso de Pós-Graduação (Mestrado) em  
Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2019.

Orientador: Alex Fernando de Almeida

Coorientador: Fabricio De Paula Coutinho

1. Tecnologia de Alimentos. 2.  $\beta$ -galactosidase. 3. Desenvolvimento de  
Novos Produtos. 4. Encapsulação. I. Título

**CDD 664**

---

TODOS OS DIREITOS RESERVADOS – A reprodução total ou parcial, de qualquer  
forma ou por qualquer meio deste documento é autorizado desde que citada a fonte.  
A violação dos direitos do autor (Lei nº 9.610/98) é crime estabelecido pelo artigo 184  
do Código Penal.

**Elaborado pelo sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFT com os  
dados fornecidos pelo(a) autor(a).**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

MAYKON JHULY MARTINS DE PAIVA

**ENCAPSULAÇÃO DE  $\beta$ -GALACTOSIDASE EM CO-  
POLÍMERO ALGINATO-PECTINA E HIDRÓLISE DE  
SORO DE LEITE E LEITE INTEGRAL**

Dissertação **DEFENDIDA** e **Aprovada** em 28 de agosto de 2019, pela Banca Examinadora

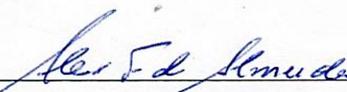
constituída pelos membros:



Prof. Dra. Bárbara Catarina Freitas  
UFT



Prof. Dr. Ezequiel Marcelino da Silva  
UFT



Prof. Dr. Alex Fernando de Almeida  
Orientador UFT

*“Descobrir consiste em olhar para o que todo mundo está vendo e pensar uma coisa diferente.”*

**ROGER VON OECH**

## AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me dado força diante das dificuldades e por ter me guiado ao longo do projeto para trilhar o caminho mais correto possível.

Aos meus pais, Sirlene e José Eurípedes (*in memoriam*) por todo amor, carinho, compreensão, apoio incondicional e ensinamentos para mim transmitidos ao longo da vida. A meu irmão Marcelo, por todo o suporte que sempre me deu, em tudo que precisei.

A minha esposa e companheira de lutas diárias, Samara, por toda atenção, suporte, apoio, carinho e sabedoria ao longo dessa caminhada. Ao meu filho, Miguel, que possa a cada dia transmitir amor e esperança por onde passar, crescendo dentro dos preceitos da fé cristã. Minha família, em vocês encontrei o bom e tranquilo momento de paz e alegria que sempre busquei, vocês tem sido sempre o alicerce e alavanca para todos os desafios que surgiram.

Ao meu orientador, Professor Dr. Alex Fernando de Almeida, por me encorajar, ter bom ânimo, presteza e boa fé, características que me deram gás e não me deixaram desistir, sempre soube me ouvir e perceber de perto as dificuldades que enfrentei, com atenção e sabedoria, obrigado por ter me repassado o conhecimento suficiente para desenvolver este tão importante trabalho. Agradeço por acreditar na minha capacidade e nunca ter deixado de confiar em mim.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Fabrício Coutinho de Paula que sempre me apoiou, ajudou e fortaleceu no momento mais difícil dessa caminhada, também concedendo coordenadas cruciais para que o trabalho fosse realizado com excelência e maestria.

À Universidade Federal do Tocantins e ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, por terem sido os canais de acesso a um programa *stricto sensu*, fazendo com que eu alcançasse o título de mestre.

Aos professores do curso por darem suas contribuições ao meu projeto, buscando sempre agregar valor científico e representatividade para a sociedade.

Aos Técnicos de Laboratório que contribuíram para a execução deste trabalho, me apoiando das mais diversas formas.

Aos meus colegas de mestrado pelos momentos de conversa, encorajamento, troca de conhecimentos e descontração.

## RESUMO

Este trabalho teve como objetivo principal investigar a imobilização da enzima  $\beta$ -galactosidase comercial de *Aspergillus oryzae* (Deslac<sup>®</sup>) em diferentes condições, bem como caracterizar a enzima livre e imobilizada visando sua aplicação na reação de hidrólise da lactose. Os experimentos foram conduzidos para identificar o melhor rendimento da imobilização em alginato de cálcio e o uso de diferentes adjuvantes. A enzima livre e imobilizada foram caracterizadas quanto às suas propriedades bioquímicas para identificar as condições reacionais adequadas de pH e temperatura para a reação de hidrólise da lactose, a ação de sais sobre a atividade enzimática, estabilidade de estocagem da enzima. As enzimas foram analisadas para a hidrólise de soro de leite e leite integral. A imobilização da enzima  $\beta$ -galactosidase obteve o melhor derivado com alginato (2% m/v), pectina (2% m/v) reticulada com glutaraldeído (25% v/v). O pH ótimo para a hidrólise da lactose usando a enzima solúvel e imobilizada foi 5,0 e 6,5 respectivamente e a temperatura ótima foi 45°C e 40°C, respectivamente. A utilização dos sais sulfato de magnésio e sulfato de manganês influenciaram na atividade enzimática em 195% e 150%, respectivamente, para a enzima imobilizada. A enzima imobilizada apresentou estabilidade de 60% após 10 dias de armazenamento. O processo de imobilização com alginato de sódio+pectina e glutaraldeído reduziu os efeitos difusionais comparados com o alginato convencional. A redução da temperatura ótima de atividade permite um processo energeticamente mais viável.

**Palavras-chave:**  $\beta$ -galactosidase, encapsulação, co-polímeros, propriedades bioquímicas.

## ABSTRACT

The aim of this work was to investigate the immobilization of the commercial *Aspergillus oryzae*  $\beta$ -galactosidase enzyme (Deslac®) under different conditions, as well as to characterize the free and immobilized enzyme using its application in lactose hydrolysis. The experiments were conducted to identify the best yield of immobilization in calcium alginate and the use of different adjuvants. The free and immobilized enzyme were characterized as to their biochemical properties, to identify the optimum pH and temperature conditions for the lactose hydrolysis reaction, the effect of salts on the enzymatic activity and enzyme storage stability. Enzymes were analyzed to moisturize whey and whole milk. Immobilization of the enzyme  $\beta$ -galactosidase yields better derivative in alginate (2% w/v), glutaraldehyde (25% v/v) crosslinked pectin (2% w/v). The optimal pH to hydrolysis lactose using a soluble and immobilized enzyme was 5.0 and 6.5, respectively, and the optimum temperature was 45 °C and 40 °C, respectively. The use of magnesium sulfate and manganese sulfate influenced enzymatic activity by 195% and 150%, respectively, for an immobilized enzyme. The immobilized enzyme showed 60% stability after 10 days of storage. The immobilization process with sodium alginate + pectin and glutaraldehyde reduced diffuse effects compared to conventional alginate. The reduction of the temperature optimal activity allows a more energy-efficient process.

**Keywords:**  $\beta$ -galactosidase, encapsulation, copolymers, biochemical properties.

## LISTA DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 1:</b> Ilustrações da ação da lactase quando ocorre sua deficiência  | 15 |
| <b>Figura 2:</b> Rotas de Conversão da enzima $\beta$ -galactosidase   | 20 |
| <b>Figura 3:</b> Hidrólise enzimática de lactose catalisada por $\beta$ -galactosidase.  | 22 |
| <b>Figura 4:</b> Influência do pH sobre a atividade enzimática de $\beta$ -galactosidase de <i>A. oryzae</i> (Deslac <sup>®</sup> ) nas formas livre e imobilizada em alginato+pectina+glutaraldeído. Condições experimentais: tampão McIlvaine (Citrato-fosfato), temperatura de reação a 35°C.   | 34 |
| <b>Figura 5:</b> Influência da temperatura sobre a enzima de $\beta$ -galactosidase de <i>A. oryzae</i> (Deslac <sup>®</sup> ) livre e imobilizada em alginato+pectina+glutaraldeído. Condições experimentais: as reações foram realizadas em tampão McIlvaine pH 5,0 para a enzima livre e em pH 6,5 para a enzima imobilizada.               | 36 |
| <b>Figura 6:</b> Perfil de energia de ativação pela equação de Arrhenius para enzima solúvel (A) e imobilizada em alginato de sódio modificado (B).  | 39 |
| <b>Figura 7:</b> Ensaios de termoestabilidade para $\beta$ -galactosidase imobilizada em alginato+pectina+glutaraldeído. Condições experimentais: as reações foram realizadas em tampão McIlvaine em pH 6,5 a 45 °C para a enzima imobilizada  | 40 |
| <b>Figura 8:</b> Ensaios de termoestabilidade para $\beta$ -galactosidase livre. Condições experimentais: as reações foram realizadas em tampão McIlvaine pH 5,0 a 40 °C para a enzima livre.  | 41 |
| <b>Figura 9:</b> Valores experimentais pelo modelo de Michaelis-Menten para atividade enzimática em função da concentração de lactose ( $\beta$ -galactosidase livre e imobilizada).   | 43 |
| <b>Figura 10:</b> Valores experimentais pelo modelo de Michaelis-Menten para atividade enzimática em função da concentração de lactose ( $\beta$ -galactosidase livre e imobilizada).  | 44 |
| <b>Figura 11:</b> Efeito da adição de sais sobre a atividade enzimática da enzima $\beta$ -galactosidase de <i>A. oryzae</i> livre e imobilizada em alginato+pectina+glutaraldeído. Condições experimentais: as reações foram realizadas em tampão McIlvaine pH 5,0 a 40 °C para a enzima livre e em pH 6,5 a 45 °C para a enzima imobilizada. | 45 |
| <b>Figura 12:</b> Avaliação da hidrólise do leite e soro de leite e reuso da enzima $\beta$ -galactosidase.  | 47 |

## LISTA DE TABELAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabela 1:</b> Principais técnicas de imobilização empregadas para imobilização enzimática.   | 18 |
| <b>Tabela 2:</b> Métodos utilizados para a imobilização de $\beta$ -galactosidase de diferentes fontes microbianas, principais características do método e aplicação. | 19 |
| <b>Tabela 3:</b> Composição do Leite Desnatado utilizado no estudo de hidrólise.  | 29 |
| <b>Tabela 4:</b> Diferentes suportes utilizados para imobilização de $\beta$ -galactosidase de <i>A. oryzae</i> (Deslac®).  | 31 |
| <b>Tabela 5:</b> Dados usados na construção do gráfico para o cálculo da energia de ativação para a enzima $\beta$ -galactosidase na forma livre e imobilizada.       | 38 |
| <b>Tabela 6:</b> Parâmetros cinéticos para $\beta$ -galactosidase livre e enzima imobilizada.   | 43 |

## SUMÁRIO

|  |    |
|--|----|
| <b>1. INTRODUÇÃO</b>   | 11 |
| <b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b>  | 13 |
| 2.1 Cenário do leite e seus derivados  | 13 |
| 2.2 Lactose  | 14 |
| 2.3 Intolerância a Lactose   | 14 |
| 2.4 Enzimas  | 16 |
| 2.5 Imobilização de Enzimas  | 17 |
| 2.6 $\beta$ -galactosidase   | 20 |
| 2.7 Hidrólise da Lactose   | 21 |
| <b>3.OBJETIVOS</b>   | 23 |
| 3.1 Objetivo Geral   | 23 |
| 3.2 Objetivo Específico  | 23 |
| <b>4. MATERIAL E METÓDOS</b>   | 24 |
| 4.1 Metodos de imobiçização  | 24 |
| 4.2 Encapsulação com alginato de sódio nativo  | 24 |
| 4.3 Métodos de Imobilização  | 24 |
| 4.3.1 Imobilização com alginato de sódio nativo  | 24 |
| 4.3.2 Imobilização com alginato de sódio/glutaraldeido   | 25 |
| 4.3.2.1 Modificações do alginato de sódio para imobilização  | 25 |
| 4.4 Determinação da atividade enzimática   | 26 |
| 4.5 Determinação de proteínas totais   | 26 |
| 4.6 Determinação dos parâmetros da imobilização  | 26 |
| 4.7 Propriedades bioquímicas da enzima livre e imobilizada   | 27 |
| 4.7.1 Determinação da atividade ótima  | 27 |
| 4.7.2 Cinética Enzimática  | 27 |
| 4.7.3 Testes de estabilidade térmica da enzima $\beta$ -galactosidase solúvel eimobilizada a 40, 50 e 60° C. | 28 |
| 4.7.4 Efeito da adição de sais sobre a atividade enzimática  | 28 |
| 4.8 Efeito da adição de sais sobre a atividade enzimática  |    |
| 4.9 Estabilidade de estocagem da enzima $\beta$ -galactosidase solúvel eimobilizada (vida de                 | 28 |

|   |           |
|---|-----------|
| prateleira)   | 28        |
| 4.10 Hidrólise do Soro de Leite e Leite Integral (Reuso)                              | 28        |
| <b>5. RESULTADOS E DISCUSSÕES</b>   | <b>30</b> |
| 5.1 Imobilização da Enzima  | 30        |
| 5.2 Caracterização das Enzimas Solúvel e Imobilizada                                  | 33        |
| 5.2.1 Efeito do pH sobre a atividade enzimática                                       | 33        |
| 5.2.2 Efeito da temperatura sobre a atividade enzimática                              | 35        |
| 5.2.3 Energia de ativação pela equação de Arrhenius                                   | 37        |
| 5.2.5 Estabilidade térmica de $\beta$ -galactosidase                                  | 40        |
| 5.2.6 Determinação dos parâmetros cinéticos $K_m$ e $V_{m\acute{a}x}$                 | 42        |
| 5.3 Efeito da adição de sais sobre a atividade enzimática                             | 45        |
| 5.4 Estabilidade de estocagem da enzima $\beta$ -galactosidase solúvel e imobilizada. | 46        |
| 5.5 Hidrólise do Soro de Leite e Leite Integral (Reuso)                               | 47        |
| <b>6. CONCLUSÃO</b>   | <b>48</b> |
| <b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>  | <b>49</b> |

## 1. INTRODUÇÃO

A lactose, um dos principais constituintes do leite e do soro, é classificada como um dissacarídeo. Atualmente seu uso em produtos lácteos é bastante restrito, por conta principalmente do seu baixo poder adoçante, além de ser um açúcar com característica higroscópica, ou seja, causa o endurecimento dos derivados lácteos em pó. Outro fator que restringe sua utilização é a intolerância que parte da população tem a esse dissacarídeo (FALLEIROS et al., 2017).

A intolerância a lactose é definida como a incapacidade do organismo de hidrolisar a lactose no intestino delgado, devido a ausência total ou quantidade abaixo do necessário da enzima lactase no aparelho digestivo. Visando contornar esses problemas, a lactose pode passar pelo processo de hidrólise resultando em glicose e galactose, açúcares com melhores propriedades físicas, químicas e nutricionais. (SOUZA et al., 2018).

Quase todas as reações químicas que se processam nos organismos passam pelo processo de catálise. Os catalisadores que fazem parte do sistema biológico natural são proteínas chamadas enzimas. Dentre as enzimas empregadas nas indústrias de alimentos, destaca-se o uso da enzima  $\beta$ -galactosidase (lactase) no processamento de leite e dos derivados lácteos (CAMPELLO et al., 2012). Lactase ( $\beta$ -galactosidase, E.C. 3.2.1.23) é a enzima responsável pela hidrólise da lactose, estando presente principalmente em microrganismos, como também em tecidos animais. O leite, com o passar dos anos, tem se tornado um dos principais alimentos consumidos pela população mundial, seja puro ou por meio de seus derivados. (PANESAR et al., 2010; DARIF, 2018).

A lactase pode ser utilizada em laticínios para produzir uma mistura isomolecular de glicose e galactose, para pessoas que apresentam intolerância a lactose, e representa uma das enzimas com grande potencial de exploração (GAVIRIA-ACOSTA, 2015).

O alto custo para aquisição e aplicação da enzima livre no processo de hidrólise do leite acaba tornando inviável o uso em escala industrial. Essa desvantagem pode ser driblada através do uso de enzimas imobilizadas, já que realizam o papel de biocatalisadores com mais estabilidade, permitindo inclusive o seu reuso, garantindo assim a diminuição de custos (HAIDER & HUSAIN, 2009).

Os métodos de imobilização de enzimas na indústria de alimentos têm ganhado espaço devido ao grande potencial em obter produtos com características melhoradas sem necessitar grandes alterações nos equipamentos já existentes na planta industrial (KESSI & ARIAS, 2019). A imobilização pode ser definida como a técnica que confina uma enzima com atividade catalítica de interesse em um sistema, impedindo sua migração para o meio, ou fase móvel, onde se encontram o substrato e o produto, pois a enzima se apresenta em sua forma física ou quimicamente associada a um suporte insolúvel (CAMPELLO et al., 2012).

A aplicação comercial de  $\beta$ -galactosidase imobilizada ainda é pouco explorada, o que tem atraído o interesse de inúmeros pesquisadores (BRAGA et al., 2012; LI, et al., 2015; MORSCHBACHER, et al., 2016; CORGNEAU et al., 2017). Os métodos de imobilização incluem adsorção em materiais insolúveis, aprisionamento em géis poliméricos, encapsulamento em membranas, ligação cruzada química usando reagentes bifuncionais ou multifuncionais, além de ligação a um transportador insolúvel (PELEG, 1988; TREVISAN, 2008).

O subproduto da fabricação de queijos, o soro de leite de vaca tem apresentado grande potencialidade para se desenvolver novos produtos alimentícios devido ao seu alto valor nutricional principalmente o pasteurizado (FERREIRA-ROCHA, 2013). Por possuir natureza perecível, o soro não pode ser estocado por longos períodos, o que gera muitos problemas com o seu descarte. Sendo assim uma alternativa viável é promover o aproveitamento desse subproduto pela indústria alimentícia (BOSSO et al., 2016). Assim, o objetivo deste trabalho foi testar a imobilização de uma lactase comercial em diferentes condições, bem como caracterizar a enzima livre e imobilizada visando sua aplicação na reação de hidrólise da lactose.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1. Cenário do Leite e seus Derivados**

Diversas pesquisas mostram que o leite é citado entre os seis primeiros produtos mais importantes da agropecuária brasileira, superando inclusive o café e o arroz. No país ele desempenha um papel relevante no fornecimento de alimentos e na geração de emprego e renda para a população (FERREIRA-ROCHA, 2013).

O setor leiteiro no Brasil tem apresentado melhorias decorrentes de inovações tecnológicas que proporcionaram a modernização dos processos produtivos. As indústrias de laticínios têm influência direta nesse desenvolvimento a partir do momento em que exigem de seus produtores a utilização de técnicas aprimoradas que assegurem a qualidade do leite produzido. Normalmente esse nível de exigência condiz com o que o consumidor espera (ALMEIDA et al., 2015).

As proteínas do leite podem ser subdivididas em caseína (80%), esta sendo a principal proteína do leite, é uma substância coloidal complexa, associada ao cálcio e ao fósforo, podendo ser coagulada por ação de ácidos, coalho e/ou álcool; e proteínas do soro (20%), que se encontram completamente dissolvidas na água do leite (FISCHER, 2010)

O leite ideal para o consumo de pessoas com intolerância a lactose está disponível em muitos países. Embora a maioria das pessoas com intolerância à lactose tenha poucos sintomas com uma dosagem de lactose <12 gramas por refeição, a tendência geral na indústria é reduzir o teor de lactose o mais baixo possível (VANSCHIPPINGEN et al; 2017)

Não há consenso global sobre os requisitos regulatórios para produtos sem lactose. Enquanto no passado a maioria dos produtores de laticínios considerava a redução da lactose como sendo suficiente para 0,5% ou 0,1%, a exigência atual em alguns países é mesmo uma redução para <0,01% antes que o leite possa ser chamado de livre de lactose (DEKER et al; 2019).

## 2.2 Lactose

Pode se definir a lactose como um dissacarídeo formado através de dois elementos: glicose e galactose unidas por ligações  $\beta - 1,4$ , que está presente no leite de quase todos os mamíferos e sua concentração variada de 2 a 10%. O leite bovino apresenta um teor de lactose entre 4,4% a 5,2 (GÄNZLE et. al, 2008).

A lactose, é o principal carboidrato do leite e de outros produtos lácteos produzidos pela indústria alimentícia, sua presença é identificada com maior facilidade no leite de mamíferos, a formação ocorre nas glândulas mamárias, através de um importante componente gerado no organismo a glicose. É considerado o componente mais importante do extrato seco do leite produzido pelo animal, que vai de 40 a 50% de sua formação, em humanos a sua presença é em menor quantidade, cerca de 7% (FISCHER, 2010).

A ingestão da lactose pode causar distúrbios intestinais para uma parcela da população que sofre de intolerância a este açúcar, ocasionada pela deficiência na produção da lactase no intestino (FOX, et al., 2015).

## 2.3 Intolerância a Lactose

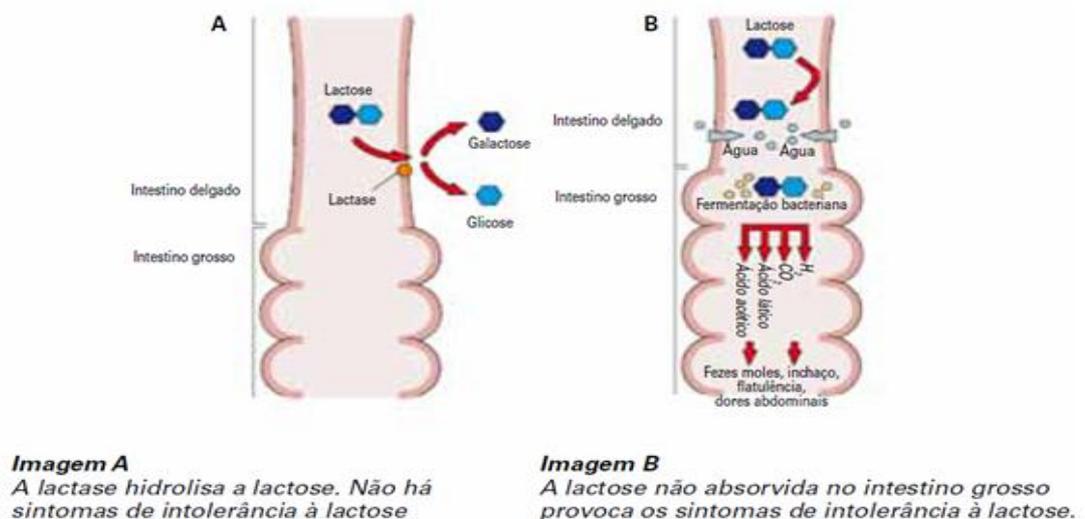
A intolerância a lactose é o que ocorre quando um indivíduo não consegue ingerir alimentos que tenham lactose em sua composição, provocando uma série de problemas e desconfortos de saúde. É o tipo mais comum de intolerância a carboidratos e atinge em todo o mundo cerca de uma boa parcela da população (MUNIZ et al., 2013; LIMA & ROCHA, 2016; SATAR, et al., 2018). A intolerância à lactose pode ainda ser definida como a incapacidade do organismo para digerir completamente a lactose, que ocorre devido aos baixos níveis (ou ausência) de atividade da enzima  $\beta$ -galactosidase na mucosa intestinal como ilustrado na Figura 1 (HEIDTMANN et al, 2012).

A resolução da diretoria colegiada (RDC) 136/2017 publicada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), determinou que fossem realizadas pelas indústrias e fabricantes, mudanças nas informações de rótulos de alimentos que contêm lactose. Os itens com mais de 100 miligramas (mg) de lactose para cada 100 gramas ou mililitros do produto obrigatoriamente devem indicar esta informação no rótulo de forma clara e de fácil localização. O estabelecimento dessas normativas criou dentro do mercado brasileiro de

alimentos, três tipos de rotulagem para a lactose: “zero lactose” ou “baixo teor”, para os produtos cujo teor de lactose tenha sido reduzido, e “contém lactose”, nos demais alimentos com presença desse açúcar (FREITAS, 2013).

É importante destacar que são descritas, na literatura, três classes de intolerância à lactose, que podem ter diversas origens: deficiência congênita da enzima; diminuição enzimática secundária oriunda de doenças intestinais; deficiência primária ou ontogenética (LONGO, 2006; FISCHER, 2010).

Deficiência congênita de lactase: é um defeito genético muito raro e manifesta-se nos recém-nascidos, logo após a primeira ou segunda ingestão de leite, sendo uma condição permanente. Diminuição enzimática secundária: é a mais comum e pode ocorrer em consequência de doenças que causam algum tipo de dano à mucosa intestinal ou após as cirurgias no aparelho digestivo. Deficiência primária: É a mais frequente em toda a população, é uma tendência normal em que o organismo com o passar da idade deixa de produzir a lactase (MATTAR E MAZO, 2015).



**Figura 1** – Ilustrações da ação da lactase e em quando ocorre sua deficiência (FREITAS, 2013)

A maioria dos casos, os sintomas da intolerância são parecidos, incluindo o inchaço do trato gastrointestinal o que provoca desconfortos como náuseas e vômitos, gases, cólicas e diarreia. A intensidade dos sintomas irá variar de acordo com a quantidade de lactose ingerida pelo indivíduo e a capacidade do mesmo em digerí-la (CORGNEAU et al., 2017).

## 2.4 Enzimas

A formação das enzimas ocorre dentro das células de todos os seres vivos, plantas, fungos e bactérias. Elas têm grande importância para o desenvolvimento de várias funções essenciais de qualquer ser vivo, incluindo os processos metabólicos que convertem nutrientes em energia e em novos materiais para as células, além de apressar, por exemplo, a reação dos processos bioquímicos, tornando-os mais eficientes (MULLER et al., 2011).

Um dos papéis primordiais das enzimas é o de promover a aceleração de uma reação termodinamicamente sem provocar mudanças na constante de equilíbrio e a energia livre de reação. Uma das diferenças básicas entre enzimas e catalisadores químicos sintéticos é a capacidade daquelas em catalisar reações sob condições suaves, em soluções aquosas, à temperatura e pressão normais, reduzindo a possibilidade de alteração de compostos sensíveis ao calor, além de reduzir as necessidades energéticas e os efeitos de corrosão de todo o processo (FERRER et al., 2016).

Tanto os catalisadores químicos, como os biológicos, perdem gradualmente sua atividade ao participar das reações que participam. A adição de enzimas aos produtos, principalmente nas indústrias de alimentos e de rações, contribui modificando matérias-primas e mais recentemente ajudando na produção de produtos específicos, destacando-se os usos em panificação, na modificação de materiais amiláceos, na fabricação de sucos de frutas, e na modificação de proteínas (ALPTEKIN et al., 2010).

Diversos estudos analisaram as condições operacionais de enzimas na sua forma livre e imobilizada, e em quase a totalidade deles as enzimas imobilizadas apresentam muitas vantagens, em comparação a livre, pois é viável a sua utilização em novos ciclos. (GAUR et al., 2006; RODRIGUES et al., 2013; BOSSO, 2016; SATAR-ANSARI, 2017).

Pode-se destacar outras situações consideradas vantajosas em relação ao uso destas, como por exemplo facilitar o controle das reações, evitar a contaminação do produto por proteína e permitir sua utilização em diferentes configurações de reatores, ou biorreatores. A técnica de imobilização de enzimas também pode reduzir a inibição frente aos produtos formados e meios reacionais (MATEO et al., 2007; SHELDON & VAN PELT, 2013; RODRIGUES et al., 2013; JAFARY, et al., 2016; ANSARI, 2018).

## 2.5 Imobilização de Enzimas

A imobilização de enzimas pode ser definida como uma técnica que confina uma enzima com atividade catalítica de interesse em um sistema. A imobilização é capaz de prevenir sua migração para o meio onde se encontram o substrato e o produto, de forma que a enzima se encontre física ou quimicamente associada a um suporte ou a uma outra estrutura que pode ser definida como matriz (CARDOSO et al., 2009).

Como qualquer outro soluto, as enzimas em solução tem completa liberdade de se movimentar, mas quando ocorre o processo de imobilização a sua capacidade de trânsito fica restrita (SOARES et al., 2017). Enzimas imobilizadas podem ser recuperadas, garantindo sua reutilização em processo seguintes, reduzindo drasticamente os custos deste insumo, sendo desta forma um fator determinante da viabilização comercial do processo (FALLEIROS et al., 2017).

Pode se destacar ainda outras situações consideradas vantajosas em relação ao uso destas enzimas na forma imobilizada como por exemplo facilitar o controle das reações, evitar a contaminação do produto por proteína e permitir sua utilização em diferentes configurações de reatores, ou biorreatores (DARIF, 2018).

É importante ressaltar que o processo de imobilização de uma enzima pode inibir ou aumentar a atividade e estabilidade desta dependendo das condições usadas no experimento, porém, não existe até agora um modelo estabelecido que defina a manutenção destes parâmetros após o processo de imobilização (DANTAS, 2017).

As enzimas estão sujeitas à inativação por fatores químicos, físicos ou biológicos, podendo esta ocorrer quando estocadas ou durante o uso. Para que a catálise seja eficiente em um determinado processo, há a necessidade de protegê-las da interação com o solvente, meio no qual é realizada a reação, pois ele poderia provocar a inativação, impossibilitando a catálise da reação (DALLA-VECCHIA et al., 2014). Na Tabela 1 são apresentados os principais métodos de imobilização de enzimas com suas vantagens e desvantagens.

O tipo da matriz desempenha um importante papel em bioprocessos contínuos. Algumas matrizes têm sido utilizadas para a imobilização da  $\beta$ -galactosidase para usos industriais. Estas matrizes principalmente poliméricas tendem a oferecer alta resistência mecânica e alta densidade, estabilidade térmica, facilidade de manuseio, taxas de fluxo elevadas em reatores contínuos e fácil regeneração (SATAR e ANSARI, 2017).

Com relação às formas de imobilização entre as mais usadas considerando o custo benéfico o método de inclusão ou microencapsulação tem demonstrado destaque, neste em especial as enzimas podem ser aprisionadas dentro da estrutura interna de alguns materiais (geralmente polímeros) na forma de géis, microcápsulas, filmes ou membranas. Um procedimento comum é preparar a solução contendo a enzima e o material polimérico e na seqüência utilizar uma técnica (secagem, polimerização) para coagular o material polimérico contendo a enzima na forma desejada (KLEIN et al., 2018).

Outro método conhecido é a imobilização por ligação cruzada, esta por sua vez é livre de suporte, e as enzimas estão ligadas umas às outras, ou a proteínas inativas (gelatina, albumina), formando uma estrutura tridimensional complexa. Pode ser obtida via métodos físicos ou químicos. Quando obtidas por métodos químicos são resultantes das ligações covalentes entre as enzimas e são favorecidas pelo uso de agentes bi ou multifuncionais. Como desvantagens do método estão a baixa retenção da atividade e a baixa estabilidade mecânica, que dificulta sua aplicação industrial, além de pouca reprodutibilidade (SHELDON e VAN PELT, 2013).

Dervaltz e colaboradores (2012) produziram  $\beta$ -galactosidase na presença de lactose, ou galactose, ou celobiose, ou xilose, ou arabinose, ou sacarose e ou glicose em frascos agitados utilizando a levedura *K. marxianus*. Com substratos diferentes o resultado demonstrou que houve importantes modificações no crescimento específico e principalmente em suas taxas de estabilidade. A lactose (2%) apresentou maior rendimento na produtividade específica, seguida por galactose, sacarose, celobiose, xilose, arabinose e glucose. Para Lima e Rocha, (2016) o soro de leite desproteínizado e suplementado serviu como fonte de carbono alternativa para *Kluyveromyceslactis* NRRL Y1564 para produzir a enzima  $\beta$ -galactosidase e obteve-se uma atividade de 3,5 U/mL com 12 h de fermentação.

**Tabela 1.** Principais técnicas de imobilização empregadas para imobilização enzimática (Adaptado de PARIZZI, 2015).

| Técnica de imobilização  | Técnica Utilizada  | Vantagem   | Desvantagem  |
|--------------------------|--|--|--|
| <b>Adsorção física</b>   | Adsorção das moléculas de enzimas sobre a superfície de matrizes sólidas sob condições físicas e químicas apropriadas. | Fácil preparação. Reuso do suporte. Manutenção da conformação enzimática e do seu sítio ativo.   | Grande dependência de fatores como pH, temperatura e concentração enzimática, causando desprendimento                                |
| <b>Ligação covalente</b> | Ligação entre a enzima e um grupamento químico ativado sobre o suporte   | Ligação muito forte, não havendo perda de enzima durante bioprocessos.<br><br>Grande variedade de grupamentos químicos para ativação e de suportes a serem | Importante saber a estrutura da enzima, e na maioria dos casos isso não acontece.<br><br>Perda da atividade enzimática, por afetar o |

|                        |   |   |   |
|------------------------|---|---|---|
|                        |   | utilizados.   | sítio ativo em alguns casos.  |
|                        |   | Reações de acoplamento enzima-suporte em condições brandas.   |   |
| <b>Ligação cruzada</b> | Ligações covalentes entre as moléculas de enzimas por ação de reagentes multifuncionais, conduzindo a agregados enzimáticos tridimensionais insolúveis em meio aquoso, sem utilizar suportes insolúveis | Enzimas imobilizadas em diferentes formas: géis enzimáticos, membranas enzimáticas e derivados adsorvidos em monocamadas. | Frequente e inevitável inativação da enzima. Condições de reação são severas. Grande dependência de fatores como pH, temperatura e concentração enzimática, tempo de reação e força iônica. |
| <b>Aprisionamento</b>  | Retenção física da enzima   | Enzima Pode ser aplicado a qualquer tipo de enzima. Processo simples. Enzimas não passam por mudanças químicas.           | Limitado a substratos e produtos de baixo peso molecular.   |

Outro fator a ser considerado é a fonte de onde se obtém a  $\beta$ -galactosidase, tendo em vista a sua grande variedade de produção em todo o mundo, o resultado pode direcionar a sua aplicação nos diversos campos da indústria como pode ser observado na Tabela 2.

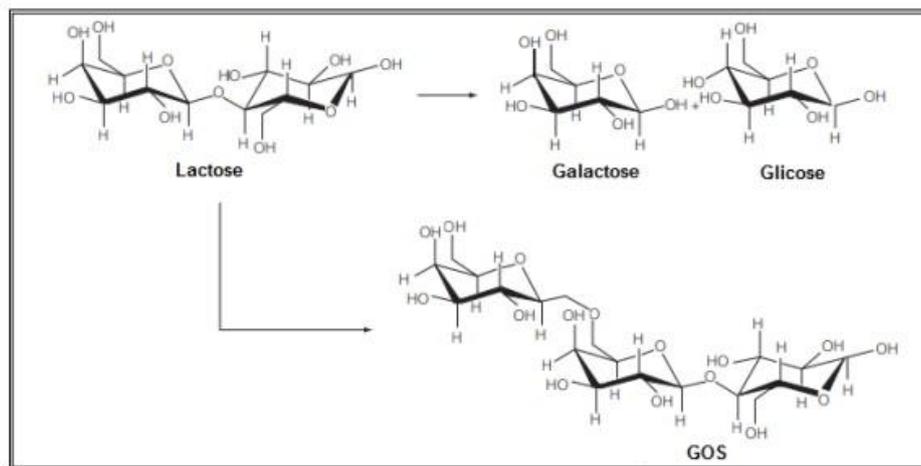
**Tabela 2.** Métodos utilizados para a imobilização de  $\beta$ -galactosidase de diferentes fontes microbianas, principais características do método e aplicação.

| Fonte da enzima                   | Método de Imobilização | Rendimento | Estabilidade Temperatura | Aplicação                              | Referência                    |
|-----------------------------------|------------------------|------------|--------------------------|--|-------------------------------|
| <i>Aspergillus oryzae</i>         | Confinamento           | 67%        | 45° C                    | Indústria de Alimentos                 | FALLEIROS et al., 2017        |
| <i>Streptococcus thermophilus</i> | Adsorção               | 49%        | 55° C                    | Indústria de Ativos Ambientais         | KLEIN, et al., 2018           |
| <i>Bacillus Circulans</i>         | Confinamento           | 66%        | 40° C                    | Indústria de Alimentos/ Biotecnologia/ | TORRES & BATISTA-VIEIRA, 2012 |

|                      |         |     |      | Saúde Pública |              |
|----------------------|---------|-----|------|---------------|--------------|
| <i>Kluyveromyces</i> | Ligação | 57% | 60°C | Indústria de  | CABUKet al., |
| <i>lactis</i>        | Cruzada |     |      | Alimentos     | 2015         |

## 2.6 $\beta$ -galactosidase

A  $\beta$ -galactosidase ou lactase é amplamente conhecida por ter a capacidade decatalisar a hidrólise de  $\beta$ -D-galactopiranosídeos, incluindo lactose, assim como reações de transgalactosilação. Para produzir galacto-oligossacarídeos (GOS) quando lactose ou qualquer outro receptor galactosil apropriado é usado (MORSCHBACHER et al., 2016). Na Figura 2 são apresentadas a forma de rotas de conversão da enzima  $\beta$ -galactosidase.



**Figura 2** – Rotas de conversão da enzima  $\beta$ -galactosidase (DARIF, 2018).

O uso da  $\beta$ -galactosidase em escala industrial ocorre, com fontes de micro-organismos considerados como seguros (Generally Recognized as Safe - GRAS). Para se ter segurança com relação ao seu uso, algumas características são avaliadas como por exemplo a termoestabilidade, a alta atividade enzimática e a temperaturas consideradas aceitáveis (LADERO et al., 2012; HUSAIN, 2010; NATH et al., 2015).

A enzima  $\beta$ -galactosidase deve ser obrigatoriamente de origem microbiana para ser utilizada na indústria alimentícia, sendo os seguintes microrganismos fontes de sua produção: *Aspergillus niger*, *A. oryzae*, *A. oryzae* expresso em *A. niger*, *Candida tropicalis*, *Kluyveromyces fragilis*, *K. lactis*, *Kluyveromyces marxianus* ou *Saccharomyces sp.* (SAQUIB et al., 2017).

A aplicação de  $\beta$ -galactosidase na hidrólise de lactose é um assunto que vem sendo discutido pelos pesquisadores e tem chamado a atenção da indústria de laticínios apesar de grande parte das indústrias ainda utilizar a  $\beta$ -galactosidase na forma livre, porém a imobilização da enzima tem apresentando resultados satisfatórios já que esta é uma área atrativa pois oferece benefícios e reduz custos de produção (KLEIN et al., 2018).

A enzima  $\beta$ -galactosidase de *A. oryzae* é considerada uma das mais propícias para se realizar a hidrólise da lactose, em especial a do soro de leite, por conta de sua boa estabilidade em ampla faixa de pH e além dos resultados de atividade ótima em pH ácido e alta estabilidade térmica (HATZINIKOLAOU et al., 2005; SANGEETHA, et al., 2015).

## 2.7 Hidrólise da Lactose

O processo de hidrólise da lactose tem se apresentado na última década como uma ferramenta promissora, principalmente para a indústria alimentícia, sendo considerada inclusive como um dos passos biotecnológicos mais importantes para se realizar a modificação de produtos compostos por leite. Esta técnica também é considerada vantajosa tendo em vista que pode, resultar na diminuição da cristalização da lactose em produtos lácteos (leite condensado, doce de leite, iogurte, sorvete, concentrados de leite ou soro) e o aumento do poder adoçante (FREITAS et al., 2011; GURDA et al., 2012; SOUZA et al., 2018).

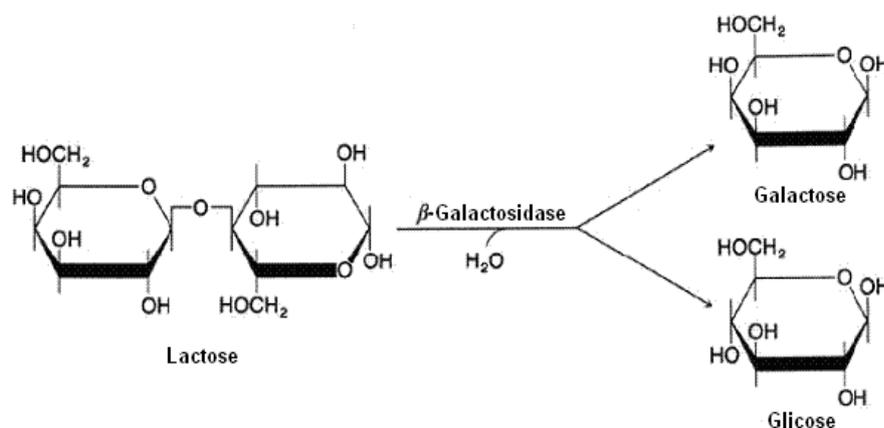
Dois métodos podem ser citados como principais na hidrólise da lactose, o método ácido e o método enzimático:

**Ácido:** a principal característica em que ocorre a reação é muito rápida, e tem como princípio o uso de soluções diluídas de ácido fortes, como sulfúrico e clorídrico, e condições operacionais severas de pH e temperatura ( $1,0 < \text{pH} < 2,0$ ;  $100 < \text{temperatura} < 150^\circ\text{C}$ ), por isto tem sua aplicação comercial na indústria alimentícia limitada, já que pode alterar significativamente as características organolépticas do alimentos (GEKAS 2015; FOX et al., 2015).

**Enzimático:** mais comum na indústria e sem centros de pesquisa, pois este tem facilmente aplicação diretamente no soro ou no leite, sem necessidade de um tratamento especial, além de não alterar características como sabor e cor. Normalmente a hidrólise é catalisada pela  $\beta$ -galactosidase e se processa em condições amenas de pH e temperatura (30 a 40°C) (GEKAS & LOPEZ-LEIVA 1985; BAILEY & OLLIS, 1986; GUIMARÃES, 2015).

Outro destaque importante com relação ao a lactose é sobre o seu grau de doçura, tendo em vista que a doçura da lactose hidrolisada é de aproximadamente 70% da sacarose. Com isso pode se chegar a um resultado a economia de sacarose no preparo de produtos que necessitam adição de açúcar para atrair o paladar do consumidor. O soro de leite hidrolisado é ideal para a preparação de lácteos como, sorvetes, bebidas ou iogurtes (FISCHER, 2010; NATHet al., 2015).

O processo de hidrólise ocorre da seguinte forma: a enzima  $\beta$ -galactosidase, a qual hidrolisa o referido dissacarídeo nos seus monossacarídeos constituintes,  $\beta$ -D-galactose e  $\alpha$ -D- glicose (FREITAS, 2013). A Figura 3 apresenta o processo químico que ocorre para hidrólise da lactose, através da enzima beta-galactosidase.



**Figura 3** – Hidrólise enzimática de lactose catalisada por  $\beta$ -galactosidase (FREITAS, 2013).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. OBJETIVO GERAL**

Avaliar a encapsulação da enzima  $\beta$ - galactosidase comercial de *Aspergillus oryzae* (Deslac<sup>®</sup>) em diferentes condições, bem como caracterizar a enzima livre e imobilizada visando sua aplicação na reação de hidrólise da lactose.

#### **3.2. OBJETIVOS ESPÉCIFICOS**

- Analisar os diferentes parâmetros de imobilização de  $\beta$ -galactosidase;
- Analisar propriedades bioquímicas dos derivados da imobilização e da enzima livre para a realização da hidrólise enzimática da lactose;
- Analisar os parâmetros cinéticos dos derivados da imobilização e da enzima livre;
- Determinar a vida de prateleira da enzima imobilizada.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1. Material**

A enzima comercial  $\beta$ -galactosidase de *Aspergillus oryzae* (Deslac Laboratório Maxinutri do Brasil) foi utilizada para os experimentos de hidrólise da lactose. O soro de leite será obtido de laticínios da região de Palmas-TO. Os demais reagentes utilizados no presente projeto serão de grau analítico.

### **4.2. Imobilização da enzima $\beta$ -galactosidase**

As soluções de alginato foram preparadas dissolvendo o alginato sólido em água destilada na concentração 2% (m/v).  $\beta$ -galactosidase solúvel e a solução de alginato (1:1) foram misturados em vórtex formando um volume total de 40 mL. A mistura alginato/enzima foi, então, gotejada em 100 mL de solução precipitante de cloreto de cálcio 0,2 M sob constante agitação com o uso de agitador magnético. As esferas de alginato recém-formadas permaneceram por mais 20 minutos na solução para garantir total solidificação das partículas, sendo em seguida separadas da solução de cálcio com o uso de papel de filtro e lavadas com água destilada. A solução de cálcio e lavagens foram reservadas e utilizadas para análises enzimáticas e conteúdo proteico.

### **4.3. Métodos de Imobilização**

#### **4.3.1. Imobilização com alginato de sódio nativo**

Adicionou-se 20 mL da solução de  $\beta$ -galactosidase em 20 mL de solução alginato de sódio (2%, p/v) e agitados até a mistura ficar homogênea. A mistura foi gotejada em 10 mL de solução de  $\text{CaCl}_2$  (147 mM) com uma seringa para formar os pellets. O tamanho dos pellets foi alterado utilizando diferentes tamanhos de seringa. Foram utilizados os seguintes calibres de seringa: 0,45mm, 0,70mm, 0,90mm.

Depois dos pellets terem formado (aproximadamente após 20 min) foram separados da solução de  $\text{CaCl}_2$  por filtração à vácuo e lavados com água destilada esterilizada. Após os pellets foram armazenados em tampão McIlvaine (Citrato-fosfato), pH 4,5 a 4 °C por 15 horas.

### **4.3.2 Imobilização com alginato de sódio/glutaraldeído**

A imobilização foi conduzida em duas etapas. Primeiro a  $\beta$ -galactosidase foi reticulada usando 2,5% da solução de glutaraldeído como segue: 2 mL de  $\beta$ -galactosidase foi adicionada a 1 mL de 25% da solução de glutaraldeído e agitados por 3 horas a 25°C. A esta solução foi adicionado o alginato de sódio (2%) e agitado até a mistura ficar homogênea. A mistura foi gotejada em 100 mL de solução de  $\text{CaCl}_2$  e lavados com água destilada esterilizada. Após os pellets foram armazenados em tampão McIlvaine pH 4,0 a 4°C por 15 horas.

#### **4.3.2.1 Modificações do alginato de sódio para imobilização**

As mesmas técnicas aplicadas para a imobilização em alginato de cálcio foram repetidas para alginato de cálcio mais adjuvantes: carboximetil celulose, quitosana, pectina e sulfato de sódio. A imobilização da enzima com e em reticulação em glutaraldeído foram analisados como segue:

Misturou-se uma solução de carboximetilcelulose, ou quitosana, ou pectina ou sulfato de sódio (1%, p/p) a uma solução de alginato de sódio (2%, p/p), até dissolver completamente. Adicionou-se a enzima reticulada com glutaraldeído ou não, resultando em uma solução diluída 40x, e a mistura foi, então, gotejada em solução precipitante de cloreto de cálcio sob constante agitação com o uso de agitador magnético. As misturas foram, então, gotejadas em solução precipitante de cloreto de cálcio 0,2M sob constante agitação com o uso de agitador magnético, deixadas sob agitação durante 10 min e as esferas foram recolhidas por filtração, e depois lavadas com água destilada.

#### 4.4 Determinação da atividade enzimática

A atividade catalítica da  $\beta$ -galactosidase solúvel e imobilizada foi determinada pelo método das velocidades iniciais da reação de hidrólise de lactose, utilizando uma solução de 100 mL de lactose em concentração (2%), em pH 4,5 a 35°C, o tempo de reação foi de 5 minutos, os testes foram realizados com base no coeficiente de extinção molar da glicose que é de 180g/mol. A glicose formada foi dosada pelo método da glicose-oxidase. A leitura foi feita em espectrofotômetro a 595nm.

A unidade de atividade (U) foi definida como grama de glicose produzida por litro do meio por minuto por grama de enzima imobilizada.

#### 4.5 Determinação de proteínas totais

As proteínas totais foram determinadas utilizando método de Bradford, utilizando soroalbumina bovina como padrão (BRADFORD, 1976).

#### 4.6 Determinação dos parâmetros da imobilização

A eficiência da imobilização foi calculada com a equação:

$$\text{Eficiência da imobilização} = \frac{C_i \cdot V_i - C_f \cdot V_f}{C_i \cdot V_i} \times 100$$

Onde,  $C_i$  é a concentração inicial de proteína,  $V_i$  é o volume inicial de enzima na solução,  $C_f$  é a concentração de proteína no filtrado total,  $V_f$  é o volume total.

O rendimento da imobilização (RI) será calculado, utilizando a equação:

$$RI = \frac{\text{atividade da enzima imobilizada}}{\text{atividade enzima livre inicial} - \text{atividade enzima na água de lavagem}} \times 100$$

A atividade da enzima imobilizada será definida com a equação:

$$\textit{Atividade da enzima imobilizada (U/g)} = \frac{\textit{atividade da enzima nos derivados}}{\textit{derivado da imobilização (g)}}$$

## 4.7 Propriedades físico-químicas da enzima livre e imobilizada

### 4.7.1 Determinação da atividade ótima

A temperatura ótima de atividade da enzima livre e imobilizada foi determinada nas temperaturas de 10 a 70 °C, com intervalos de 5 °C, em tampão Mcilvaine pH 4,5. O pH ótimo de atividade foi determinado em diferentes tampões variando o pH de 3 a 8, com intervalos de 0,5. A determinação da atividade foi determinada conforme descrito anteriormente.

### 4.7.2 Cinética Enzimática

Para o cálculo dos parâmetros cinéticos  $K_m$  e  $V_{m\acute{a}x}$  foi empregado o método gráfico de Lineweaver-Burk, a partir do modelo de Michaelis-Menten como segue abaixo:

$$V_o = \frac{V_{m\acute{a}x} [S_o]}{K_m + [S_o]}$$

Através da linearização da Equação anterior obtém-se uma nova equação:

$$\frac{1}{V_o} = \frac{K_m}{V_{m\acute{a}x}} \frac{1}{[S_o]} + \frac{1}{V_{m\acute{a}x}}$$

#### **4.7.3 Testes de estabilidade térmica da enzima $\beta$ -galactosidase solúvel e imobilizada**

Para se avaliar a estabilidade térmica da enzima  $\beta$ -galactosidase solúvel e imobilizada amostras foram testadas em banhos termostáticos que estavam calibrados nas temperaturas de 40,50 e 60 °C. Periodicamente, alíquotas foram retiradas e suas atividades residuais foram determinadas sendo o intervalo do tempo 0 a 1440 minutos (24 horas). Após o cálculo de todas as atividades iniciais e residuais, calculou-se a atividade relativa que foi definida como a razão entre a atividade enzimática do estado final e a atividade enzimática do estado inicial.

#### **4.7.4 Efeito da adição de sais sobre a atividade enzimática**

Seguindo os parâmetros já definidos para identificação das atividades enzimáticas da enzima solúvel e imobilizada, nestes testes foram usados diferentes sais adicionados ao meio reacional para identificar a capacidade de modificação dos resultados em atividade específica, foram eles: sulfato de manganês ( $\text{MnSO}_4$ ), cloreto de sódio ( $\text{NaCl}$ ), cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ), e sulfato de magnésio ( $\text{MgSO}_4$ ). Concentração utilizada: 10 mM, pH: 4,5 e temperatura de 45,0 °C. Os resultados obtidos tiveram como parâmetro o controle.

#### **4.8 Estabilidade de estocagem da enzima $\beta$ -galactosidase solúvel e imobilizada**

A  $\beta$ -galactosidase solúvel e imobilizada foram estocada em tampão McIlvaine (citrato-fosfato) a pH 4,5 a 10 °C (em geladeira). A cada 5 dias, amostras foram retiradas e a atividade da enzima foi medida. Sendo considerada a sua perda de atividade enzimática abaixo de 50% quando se compara a sua atividade inicial (controle).

#### **4.9 Hidrólise do Soro de Leite e Leite Integral**

$\beta$ -Galactosidase imobilizada foi utilizada sucessivamente em reações de hidrólise com lactose, e a atividade da primeira reação foi considerada 100%. Após um ciclo, as mesmas partículas (enzima ligada ao suporte) foram removidas do meio de reação, lavadas com tampão citrato-fosfato (McIlvaine) pH 4,5 e reutilizadas, sendo esse procedimento repetido por 4 ciclos de uso. O mesmo procedimento foi realizado utilizando soro de leite e leite

comercial integral. A composição do leite utilizado neste experimento é apresentada na Tabela 3.

Nesta etapa, estudou-se a aplicação da enzima  $\beta$ -galactosidase na hidrólise da lactose. As reações foram conduzidas em batelada, utilizando tubos de ensaio, contendo 50 mL de uma solução sintética (lactose 2,0% (m/v) em tampão McIlvaine citrato-fosfato pH 4,5). A reação foi iniciada adicionando-se 0,1 mL de extrato enzimático, ou 0,1 g de enzima imobilizada. A cada tempo pré-determinado, retiraram-se amostras (100  $\mu$ L).

**Tabela 3** - Composição do Leite Desnatado utilizado no estudo de hidrólise.

|                    | <b>Quantidade</b> |
|--------------------|-------------------|
| Valor Energético   | 83 kcal=349kJ     |
| Carboidratos       | 9,2 g             |
| Proteínas          | 6,2 g             |
| Gorduras Totais    | 2,4 g             |
| Gorduras Saturadas | 1,4 g             |
| Gorduras Trans     | 0 g               |
| Colesterol         | 0 mg              |
| Fibra Alimentar    | 0 g               |
| Sódio              | 120 mg            |
| Cálcio             | 243 mg            |

Composição fornecida pela empresa Leitbom para 200mL de leite.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES.

### 5.1 Imobilização da Enzima

A Tabela 4 mostra os resultados obtidos referentes à imobilização de  $\beta$ -galactosidase comercial de *A. oryzae*(Deslac<sup>®</sup> Laboratório Maxinutri do Brasil) em diferentes suportes. A recuperação da atividade enzimática foi calculada com base no valor da atividade inicial da enzima  $\beta$ -galactosidase, determinada sobre o substrato lactose.

Diante dos resultados com a imobilização da enzima em alginato convencional observou-se atividade específica de 0,71 U/mg, eficiência da imobilização de 74,42% e rendimento de 3,19%. Embora a eficiência da imobilização tenha sido relativamente alta quanto ao total de enzima inicial aplicado no sistema, os resultados de atividade específica e de rendimento da imobilização apontam para prováveis problemas difusionais do procedimento, podendo estar relacionado com a movimentação do substrato para o interior das pérolas de alginato e saída do produto para o meio reacional.

Ahmedi et al. (2015) relataram o coeficiente de difusão de substratos em esferas de alginato de cálcio contendo peroxidase imobilizada. Os autores explicam que o biopolímero primeiro reduz o volume disponível para a entrada do substrato, sendo denominado efeito de exclusão.

E que a parte impenetrável do biopolímero aumenta o comprimento do caminho para o movimento do substrato, sendo denominado efeito obstrução. Com isso os valores experimentais podem variar significativamente comparados com aqueles obtidos para biocatalizadores solúveis.

**Tabela 4.** Diferentes suportes utilizados para imobilização de  $\beta$ -galactosidase de *A. oryzae*(Deslac®).

| <b>Matriz</b>   | <b>Proteína no derivado (mg/g)</b> | <b>Atividade específica no derivado (U/mg)</b> | <b>Eficiência da Imobilização %</b> | <b>Rendimento da Imobilização %</b> |
|---|------------------------------------|--|-------------------------------------|-------------------------------------|
| Alginato de sódio 2%.   | 1,23±0,08                          | 0,71±0,01                                      | 74,42 ±4,93                         | 3,19%                               |
| Alginato de sódio 2% (p/v) + CMC 1% (p/v)                                 | 0,72±0,08                          | 7,65±0,64                                      | 43,01 ±5,29                         | 43,68%                              |
| Alginato de sódio 2% (p/v) + Quitosana 1% (p/v).                          | 1,09±0,15                          | 5,81±1,14                                      | 48,64 ±6,78                         | 30,54%                              |
| Alginato de sódio 2% (p/v) + Pectina 1% (p/v)                             | 0,94±0,13                          | 5,66±1,93                                      | 53,29 ± 7,79                        | 32,58%                              |
| Alginato de sódio 2% (p/v) + NaSO4 1% (p/v).                              | 0,85±0,17                          | 4,94±0,50                                      | 49,87 ± 6,35                        | 24,26%                              |
| Alginato de sódio 2% + Glutaraldeído (2:1 v/v)                            | 1,52±0,09                          | 3,82±0,35                                      | 64,21 ±3,94                         | 40,69%                              |
| Alginato de sódio 2% (p/v) + CMC 1% (p/v) + Glutaraldeído (2:1 v/v)       | 0,98±0,15                          | 6,36±0,82                                      | 50,28 ±7,81                         | 32,14%                              |
| Alginato de sódio 2% (p/v) + Quitosana 1% (p/v) + Glutaraldeído (2:1 v/v) | 1,04±0,05                          | 4,34±0,12                                      | 54,66 ±2,94                         | 22,80%                              |
| Alginato de sódio 2% (p/v) + Pectina 1% (p/v) + Glutaraldeído (2:1 v/v)   | 0,61±0,00                          | 11,97±0,22                                     | 30,83 ± 0,31                        | 59,03%                              |
| Alginato de sódio 2% (p/v) NaSO4 1% (p/v) + Glutaraldeído (2:1 v/v)       | 0,80±0,05                          | 6,92±0,56                                      | 54,18 ± 3,52                        | 42,50%                              |

A modificação de matrizes para a imobilização de enzimas por adjuvantes tem importante papel na capacidade no estabelecimento de redes e garantir uma maior estabilidade do sistema bem como a difusão dos produtos da reação. Se de um lado um suporte escolhido pode aumentar o tempo de meia-vida da enzima que passou pela imobilização, de outro uma escolha equivocada também pode alterar completamente o desempenho completo de todo o sistema (TIEN et al., 2004). Dessa forma, a enzima  $\beta$ -galactosidase foi submetida a tratamentos com glutaraldeído previamente à adição ao alginato e modificações na matriz de alginato foram realizadas com a adição de adjuvantes pectina, carboximetil celulose (CMC), quitosana e sulfato de sódio (Tabela 4).

A adição dos adjuvantes CMC, quitosana, pectina e sulfato de sódio em associação do alginato melhorou a recuperação da atividade específica entre 85,62% e 90,72% comparado ao alginato de sódio (0,71 U/mg de proteína). O rendimento da imobilização também aumentou com a adição dos adjuvantes entre 24,26% e 43,68%, sendo o maior valor observado com CMC. Por outro lado, a eficiência da imobilização reduziu consideravelmente comparado com o alginato sem modificações. O uso de adjuvantes na imobilização de diversas foram utilizados juntamente com alginato para otimizar as condições experimentais tais como atividade enzimática, estabilidade e reuso (KUMAR et al., 2017; SEKER & ZAIN, 2016; NERYA & KUBOTA, 2016). Os autores relataram que a adição de adjuvantes melhoraram as condições difusionais das matrizes de imobilização por meio da observação das alterações dos parâmetros cinéticos das enzimas. Gauret et al. (2006) imobilizaram  $\beta$ -galactosidase de *A. oryzae* em quitosana, sendo que a recuperação enzimática após o processo de imobilização foi de 18,4%.

O tratamento inicial da enzima  $\beta$ -galactosidase com glutaraldeído foi realizado para promover ligações cruzadas entre as moléculas protéicas. Nestas condições experimentais, a matriz contendo alginato-pectina-glutaraldeído apresentou os melhores resultados para atividade específica (11,97 U/mg) e rendimento (59,03%). Este resultado indica que a maior recuperação da atividade enzimática específica foi favorecida pela diminuição dos efeitos difusionais observados por Ahmedi et al. (2015) durante a imobilização de peroxidase em alginato de cálcio. Satar et al. (2018) verificaram que o papel do glutaraldeído na estabilidade de transposição para sistemas de  $\beta$ -galactosidase imobilizados é mais eficiente e eficaz em comparação com outros aldeídos na formação de ligações cruzadas estáveis, porque promove maior estabilidade operacional e térmica, além de ser mais efetivo na hidrólise da lactose do leite em reatores contínuos e em batelada. Tanriseven e Dogan (2016) imobilizaram a enzima

$\beta$ -galactosidase *A.oryzae* em fibras compostas de alginato e gelatina reticuladas com glutaraldeído. Os autores observaram que o processo de imobilização resultou em 56% da atividade enzimática relativa retida por 35 dias.

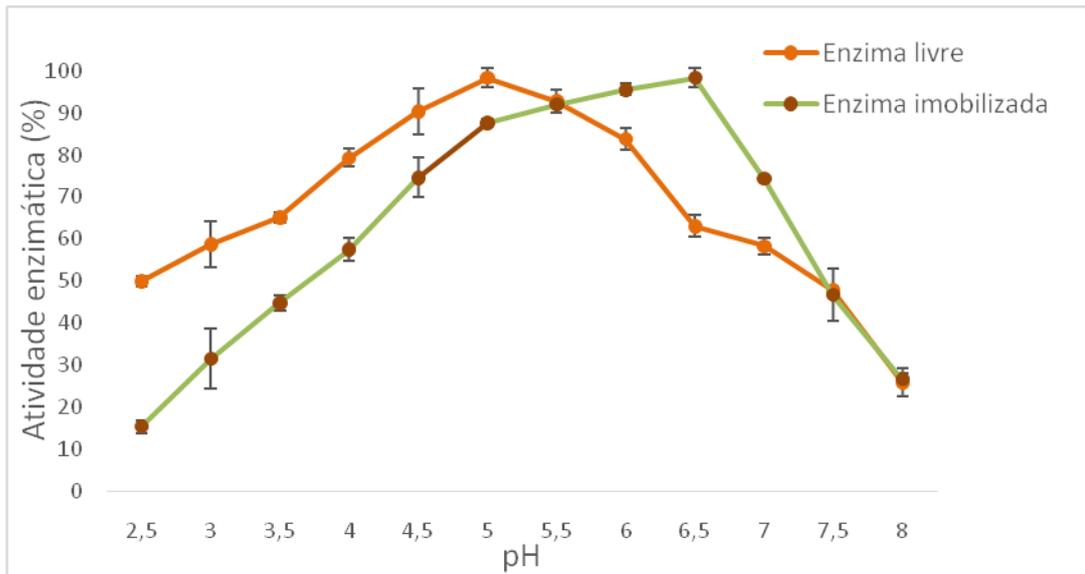
Diante das condições e hipóteses analisadas, por apresentar maior rendimento e maior atividade específica em proteínas optou-se por utilizar o suporte alginato de sódio 2% (p/v) + pectina 1% (p/v) + glutaraldeído (2:1 v/v) na sequência do estudo.

## **5.2 Caracterização das Enzimas Solúvel e Imobilizada**

### **5.2.1 Efeito do pH sobre a atividade enzimática**

Na Figura 4 são apresentados os resultados para o efeito do pH sobre a atividade enzimática da enzima livre e imobilizada. O pH exerce uma função fundamental sobre a estrutura tridimensional da enzima alterando o seu comportamento ácido-básico da molécula e do substrato (CAMPELLO, et al., 2012).

. A maioria das enzimas tem um valor de pH característico em que sua atividade é máxima, em valores acima ou abaixo deste valor a atividade se reduz, podendo ocorrer desnaturação irreversível em extremos de pH. Em geral, lactases oriundas de leveduras apresentam um pH ótimo em torno de 6,0 – 7,0, o que foi observado neste estudo. A variação da atividade das enzimas em diferentes valores de pH refletem o pH no qual importantes grupos doadores ou receptores de prótons no sítio catalítico estão em seus estados de ionização adequados (TORRES e BATISTA, 2012).



**Figura 4** – Influência do pH sobre a atividade enzimática de  $\beta$ -galactosidase de *A. oryzae*(Deslac<sup>®</sup>) nas formas livre e imobilizada em alginato+pectina+glutaraldeído. Condições experimentais: tampão McIlvaine (Citrato-fosfato), temperatura de reação a 35°C.

A enzima  $\beta$ -galactosidase apresentou atividade ótima em pH distintos para a livre (pH 5,0) e imobilizada (pH 6,5) com queda acentuada da atividade acima e abaixo destes valores ótimos, respectivamente. Na enzima imobilizada observou-se a formação de uma faixa do pH de 5,0 a 6,5, situação que pode ser explicada por conta da afinidade de *A. oryzae* com pH mais ácidos. Observou-se ainda que a enzima imobilizada apresentou baixa atividade enzimática abaixo de pH 4,0, enquanto para a enzima solúvel houve atividade enzimática de 60% em pH 3,5.

Ansari et al. (2018) ao avaliarem imobilização de  $\beta$ -galactosidase em nanopartículas de agarose sintetizada conseguiram observar que em condições mais ácidas, como pH 3,0, a  $\beta$ -galactosidase solúvel perdeu mais de 65% de atividade, enquanto a enzima imobilizada reteve 84% de atividade. Sob condições mais alcalinas, tais como pH 8, a enzima livre perdeu 83% de atividade, enquanto a enzima imobilizada reteve 46% de atividade, indicando assim que a resistência da  $\beta$ -galactosidase à desnaturação ácida e básica aumentou notavelmente após a imobilização. Esses resultados podem ser explicados porque o pH provoca uma mudança drástica na estrutura tridimensional da enzima, além das cargas iônicas dos resíduos da enzima que catalisam a reação e o caráter iônico do substrato, sendo que é importante

considerar ainda que esse processo pode alterar o microambiente da enzima e consequentemente a atividade hidrolítica do biocatalisador.

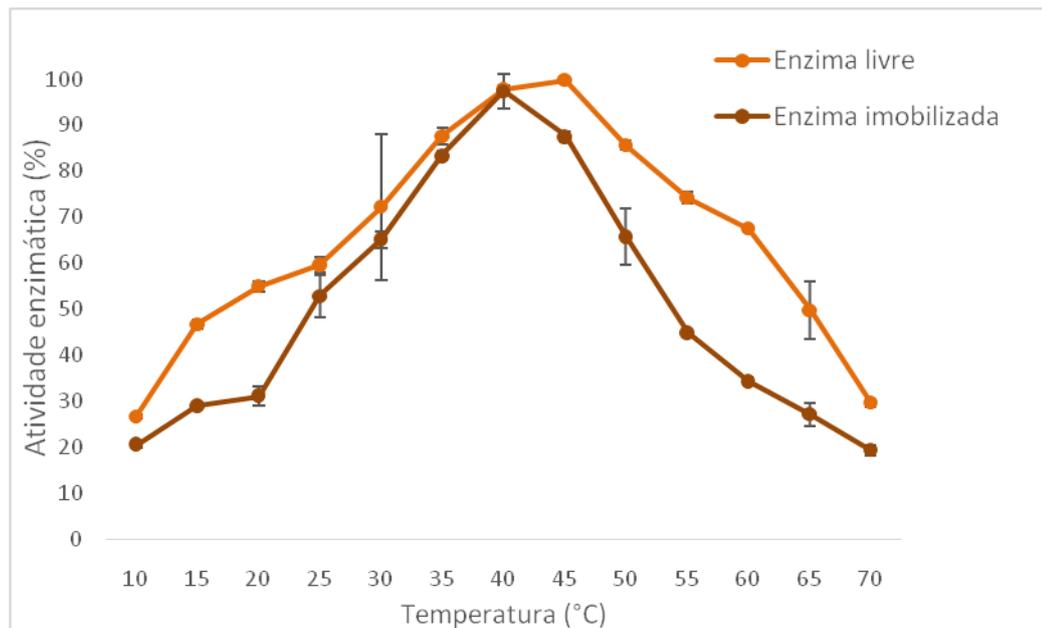
Hernaiz e Crout (2010) também observaram mudança no pH ótimo da enzima ao avaliarem a imobilização de  $\beta$ -galactosidase comercial produzida pela bactéria *Bacillus circulans* em Eupergit® C. Os autores observaram pH ótimo de atividade para a enzima livre em 6,0, para a enzima imobilizada o pH ótimo foi de 5,3. Zhou e Chen (2001) ao realizar a imobilização de  $\beta$ -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* em grafite observaram que ocorreu uma mudança no pH ótimo para um valor alcalino (7,7) ao ser comparado com a enzima livre (6,6). Dwevedi e Kayastha (2009) ao avaliarem o pH ótimo da enzima  $\beta$ -galactosidase produzido por *Pisums ativum* imobilizada em quitosana (1% m/v) reticulada com glutaraldeído nos substratos obtiveram valores de 2,8 e 4,4, respectivamente para a enzima imobilizada e livre. Campello et al., (2012) ao avaliarem a imobilização  $\beta$ -galactosidase em Eupergit C, conseguiram identificar que a enzima livre e imobilizada apresentaram pH ótimo 6,6 com queda acentuada da atividade acima e abaixo deste valor. Os autores observaram ainda que a enzima livre não apresentou atividade enzimática abaixo de pH 6,0, enquanto para a enzima imobilizada houve atividade enzimática até pH 4,6. Por outro lado, a enzima, quando imobilizada, não apresentou atividade enzimática em pH 7,6 a 8,6.

### 5.2.2 Efeito da temperatura sobre a atividade enzimática

A influência da temperatura enzimática foi determinada através das atividades das enzimas  $\beta$ -galactosidase livre e imobilizada na faixa de 10 a 70°C (Figura 5). A maior atividade enzimática da enzima livre foi observada a 45 °C, enquanto para a enzima imobilizada foi a 40 °C. Pode-se verificar ainda que a enzima solúvel apresentou maiores valores de atividade entre 35°C e 45°C, com uma queda acentuada acima de 45°C, resultado que pode ser atribuído a desnaturação protéica, comportamento similar também observado para a enzima imobilizada.

As reações enzimáticas, como na maioria das reações químicas, têm sua velocidade acelerada pelo aumento da temperatura, dentro da faixa em que a enzima é estável e mantém sua atividade integral (LI-LI et al., 2015). Ao se aumentar a temperatura, acredita-se que ocorre um aumento na atividade da enzima, sendo isto resultado de colisões entre enzima e

substrato. Este aumento na atividade termina quando se inicia o processo conhecido como desnaturação, que por sua vez é provocada por conta das condições de temperaturas, quando as colisões se tornam desordenadas, tendendo ao rompimento das interações moleculares da estrutura enzimática, diminuindo sua atividade catalítica (ALPTEKIN, 2010).



**Figura 5.** Influência da temperatura sobre a enzima de  $\beta$ -galactosidase de *A. oryzae*(Deslac<sup>®</sup>) livre e imobilizada em alginato+pectina+glutaraldeído. Condições experimentais: as reações foram realizadas em tampão McIlvaine pH 5,0 para a enzima livre e em pH 6,5 para a enzima imobilizada.

Campello et al. (2012) observaram atividade ótima da enzima  $\beta$ -galactosidase a 45 oC para as enzimas livres e imobilizadas em Eugerpit<sup>®</sup>. Ladero et al. (2012) observaram atividade ótima a 40°C para a enzimas  $\beta$ -galactosidase proveniente de *Kluyveromyces fragilis* imobilizada em sílica-alumina. Satar e Ansari (2017) ao avaliarem  $\beta$ -galactosidase a partir de *Cicerarietinum* em uma matriz de agarose funcionalizada com glutaraldeído observaram temperatura ótima 50 °C. Alves (2008) avaliaram que a temperatura ótima para a  $\beta$ -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* livre e imobilizada foi de 37°C e 40°C, respectivamente. Heidtmann et al. (2012) realizando a caracterização cinética e termodinâmica de  $\beta$ -galactosidase de *K.marxianus* CCT 7082 fracionada com sulfato de amônio observaram temperatura ótima de 45-50 °C. Os autores consideraram que o processo

de imobilização não alterou os fatores de temperatura ótima. Cabuk et al. (2014) estudaram a imobilização de  $\beta$ -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* em matriz de quitosana – hidroxiapatita e verificaram não existir alterações na temperatura ótima da enzima (37°C) quando se comparou a sua forma livre e imobilizada.

### 5.2.3 Energia de ativação pela equação de Arrhenius

Para o cálculo de energia de ativação se avalia a teoria de que ao levar todas as moléculas de um mol de uma substância até o estado de transição, necessita-se de uma quantidade de energia definida como energia de ativação ( $E_a$ ) (CAMPELLO et al., 2012). Para seu cálculo, utilizou-se os valores da atividade enzimática em função da temperatura, para ambas as enzimas livre e imobilizada (Tabela 5).

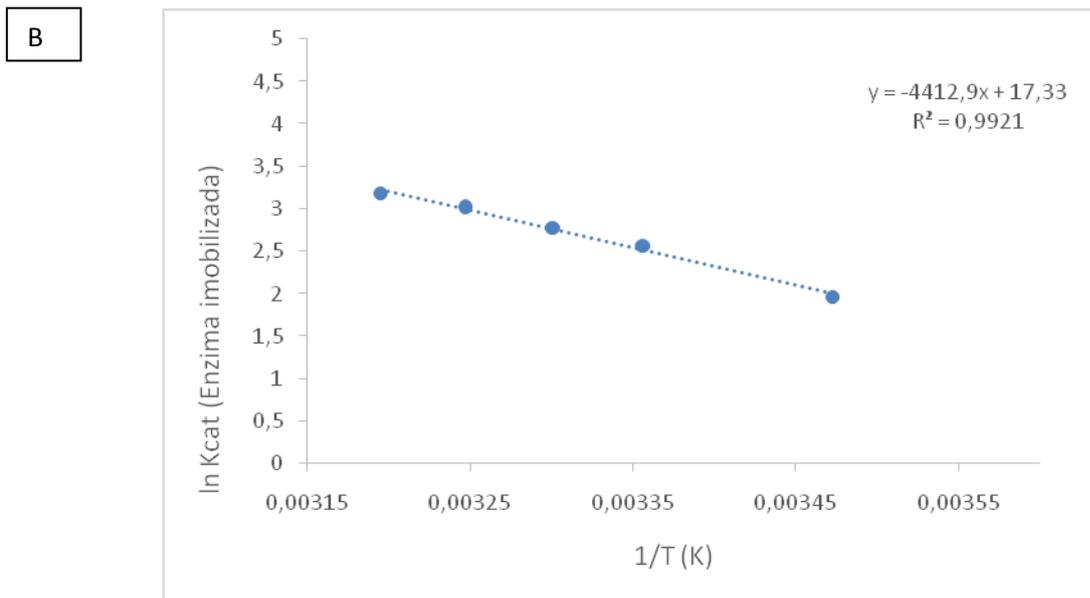
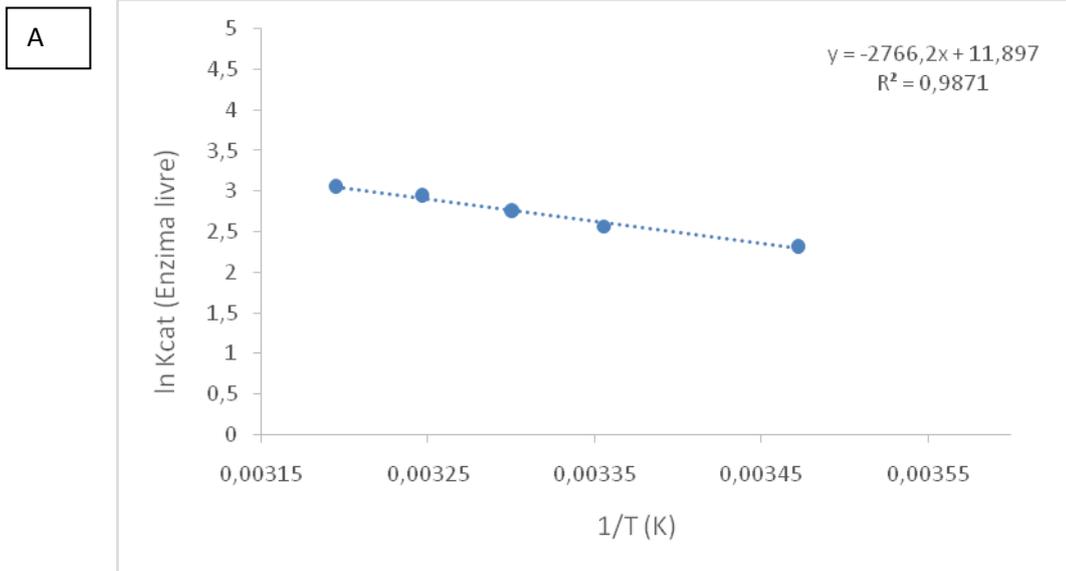
Considerando que  $R$  é igual a  $8,314 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  a energia de ativação calculada corresponde  $22,99 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  e  $36,68 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  para as enzimas livre e imobilizada, respectivamente.

Na Figura 6 (A e B) é apresentado o perfil de energia de ativação pela equação de Arrhenius para enzima solúvel (A) e imobilizada em alginato de sódio modificado. A energia de ativação ( $E_a$ ) para transformação de reagentes em produtos em reações enzimáticas está compreendida entre  $6,0$  e  $15,0 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$  (correspondendo a  $25,10$  a  $62,76 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ).

**Tabela 5** – Dados usados na construção do gráfico para o cálculo da energia de ativação para a enzima  $\beta$ -galactosidase na forma livre e imobilizada.

| <b>Atividade Enzimática Específica</b> |            |                       |                           |
|--|------------|-----------------------|---------------------------|
| <b>(U/mg)*</b>                         |            |                       |                           |
| <b>T</b>                               | <b>T</b>   | <b>Enzima solúvel</b> | <b>Enzima imobilizada</b> |
| <b>(°C)</b>                            | <b>(K)</b> |                       |                           |
| 10                                     | 283        | 3,93                  | 3,44                      |
| 15                                     | 288        | 6,90                  | 4,85                      |
| 20                                     | 293        | 8,11                  | 5,22                      |
| 25                                     | 298        | 8,80                  | 8,86                      |
| 30                                     | 303        | 10,67                 | 10,91                     |
| 35                                     | 308        | 12,94                 | 13,98                     |
| 40                                     | 313        | 14,44                 | 16,33                     |
| 45                                     | 318        | 14,73                 | 14,69                     |
| 50                                     | 323        | 12,64                 | 11,02                     |
| 55                                     | 328        | 10,96                 | 7,52                      |
| 60                                     | 333        | 9,96                  | 5,74                      |
| 65                                     | 338        | 7,35                  | 4,55                      |
| 70                                     | 343        | 4,36                  | 3,25                      |

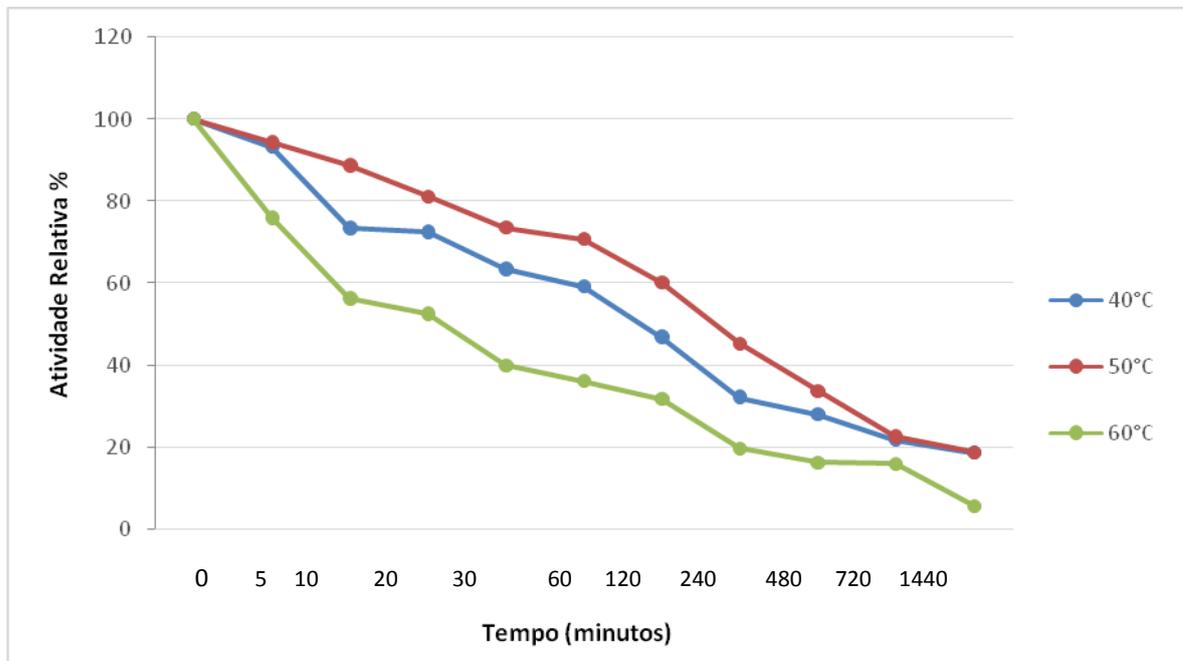
\* Valores médios de dois experimentos



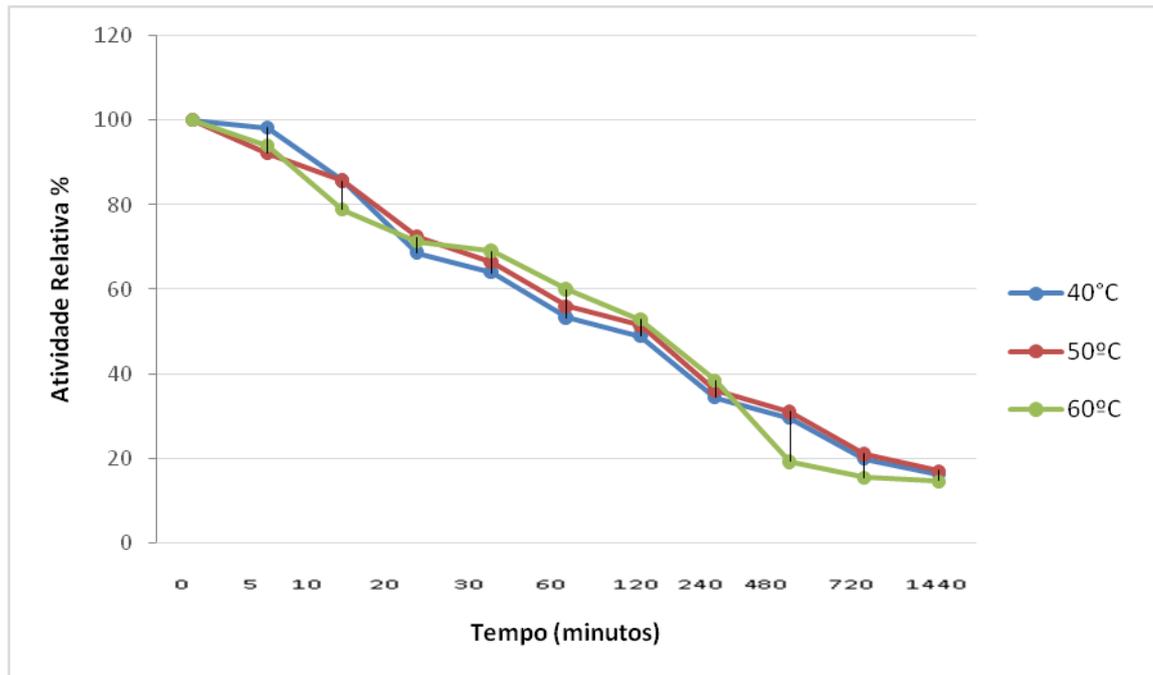
**Figura 6.** Perfil de energia de ativação pela equação de Arrhenius para enzima solúvel (A) e imobilizada em alginato de sódio modificado (B).

### 5.2.5 Estabilidade Térmica de $\beta$ -galactosidase

A estabilidade térmica da enzima  $\beta$ -galactosidase de *A. oryzae* (Deslac<sup>®</sup>) foi analisada nas temperaturas de 40 °C, 50 °C e 60 °C (Figuras 7 e 8). A influência da temperatura na estabilidade de  $\beta$ -galactosidase imobilizada foi estudada a partir dos resultados das atividades relativas em função do tempo de incubação, nas temperaturas estudadas. O efeito da imobilização sobre a estabilidade térmica tem sido demonstrada por vários trabalhos, havendo uma relação direta do aumento da estabilidade com o processo de imobilização devido ao aumento de ligações da enzima ao suporte (GURDAS et al., 2012; FREITAS, 2013, DEKER et al., 2019).



**Figura 7.** Ensaio de termoestabilidade para  $\beta$ -galactosidase imobilizada em alginato+pectina+glutaraldeído. Condições experimentais: as reações foram realizadas em tampão McIlvaine em pH 6,5 a 45 °C para a enzima imobilizada.



**Figura 8.** Ensaio de termoestabilidade para  $\beta$ -galactosidase livre. Condições experimentais: as reações foram realizadas em tampão McIlvaine pH 5,0 a 40 °C para a enzima livre.

Os resultados obtidos para a  $\beta$ -galactosidase de *A. oryzae* imobilizada ou livre mostram que a enzima não apresentou diferenças quanto a termoestabilidade nos processos utilizados na imobilização. A meia-vida da atividade enzimática ( $T_{1/2}$ ) para a temperatura de 40 °C foi de 120 min; a 50 °C foi observada a 240 min para a enzima imobilizada e 120 min para livre. Para a temperatura de 60°C a enzima reteve 50% da atividade após 30 min para a enzima imobilizada e livre. Araújo et al. (2015) analisaram a estabilidade térmica de  $\beta$ -galactosidase imobilizada em duolite A568. Os autores verificaram que reteve 50% da atividade após 30 min de incubação à 55 °C e 60 °C; enquanto a 65,0 °C a meia-vida da enzima foi observada após 15 minutos de incubação.

A termoestabilidade de enzimas imobilizadas foi estudada por vários autores, mostrando que a imobilização pode oferecer maior resistência a inativação térmica (ZHOU & CHEN, 2001; BOSSO et al., 2016; SOUZA et al., 2018). Bosso et al. (2016) ao avaliar a estabilidade térmica da  $\beta$ -galactosidase de *K.lactis* e *A.oryzae* verificaram que o aumento da velocidade de inativação da enzima  $\beta$ -galactosidase de *K. lactis* foi diretamente proporcional ao aumento da temperatura, principalmente a partir de 40°C. Os autores observaram que a enzima de *A. oryzae* mostrou-se mais resistente ao aumento da temperatura; enquanto a enzima de *K. lactis* apresentou uma correlação linear negativa, entre o tempo de reação e a

porcentagem de hidrólise da lactose, apenas nas temperaturas de 30 °C e 35°C. Rossetto et al. (2013) analisaram a termoestabilidade de uma enzima  $\beta$ -galactosidase comercial no soro de queijo. Os autores observaram que nas temperaturas de 30°C, 35°C e 40°C a enzima mostrou-se estável durante todo o ensaio. Já na temperatura de 45 °C a enzima perdeu 19,44% de sua atividade após 80 minutos e a 50 °C, após 40 minutos estava praticamente inativa.

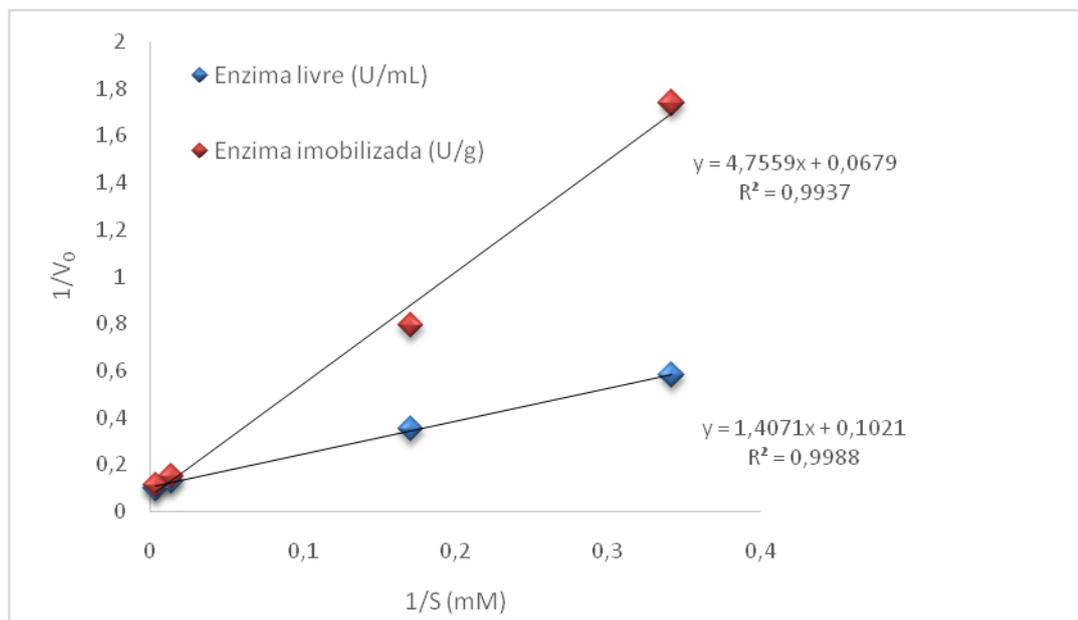
### 5.2.6 Determinação dos parâmetros cinéticos $K_m$ e $V_{m\acute{a}x}$

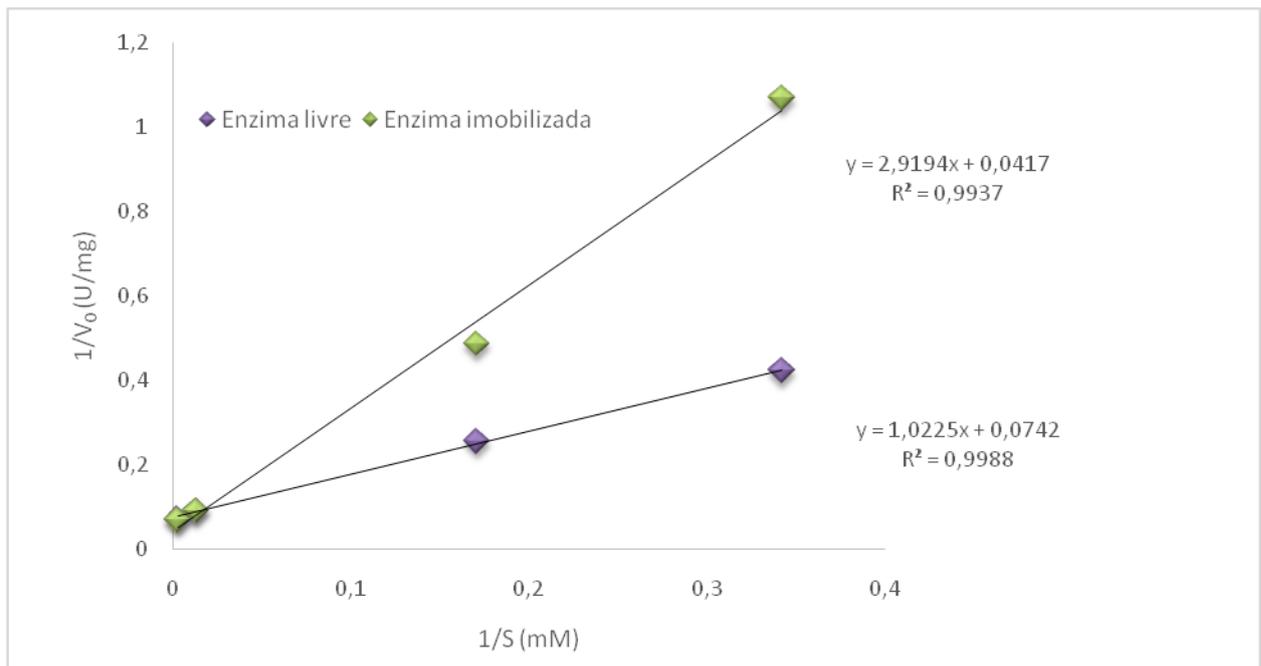
Para determinação dos parâmetros cinéticos  $K_m$  e  $V_{m\acute{a}x}$  foi utilizada uma faixa de concentração de 10 a 70 g/l de lactose para medida da atividade enzimática, tanto da enzima livre como da enzima imobilizada. Os resultados obtidos das constantes cinéticas de  $K_m$  e  $V_{m\acute{a}x}$  são apresentados na Tabela 6 e nas Figuras 7 e 8. As velocidades iniciais de reação foram observadas por meio das diferentes concentrações de lactose. Freitas (2013) explica que avaliando o efeito de concentrações cada vez maiores, medindo a velocidade a cada aumento da concentração, os aumentos da velocidade serão cada vez menores, conferindo uma aproximação lenta e gradual do estado de saturação da enzima pelo substrato.

A constante  $K_m$  de  $\beta$ -galactosidase imobilizada em alginato+pectina+glutaraldeído foi maior que a da livre (70,00 mmol.L<sup>-1</sup> e 13,78 mmol.L<sup>-1</sup>, respectivamente). Por outro lado, a velocidade máxima para a enzima imobilizada foi 1,78 vezes superior comparado à enzima livre (23,98 mmol.L<sup>-1</sup>.min). Estes resultados já era esperado, uma vez que durante esse de imobilização por encapsulação a enzima sofre maior efeito difusional. Pode-se observar ainda que os dados experimentais para enzima livre e imobilizada apresentaram ajuste de 99% ao modelo de Michaelis-Menten. De acordo com Gomes et al. (2006), além dos fatores difusionais, os resultados cinéticos podem também ser influenciados pela concentração de enzimas na matriz, força iônica, temperatura, velocidade de transferência de massa e de reação.

**Tabela –6** Parâmetros cinéticos para  $\beta$ -galactosidase livre e enzima imobilizada.

| Preparação enzimática                     | $K_m$ (mmol L <sup>-1</sup> ) | $V_{max}$ (mmol L <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> ) |
|---|-------------------------------|---|
| Enzima solúvel                            | 13,78                         | 13,48   |
| Enzima Imobilizada em alginato modificado | 70,00                         | 23,98   |

**Figura 9.** Valores experimentais pelo modelo de Michaelis-Menten para atividade enzimática em função da concentração de lactose ( $\beta$ -galactosidase livre e imobilizada).



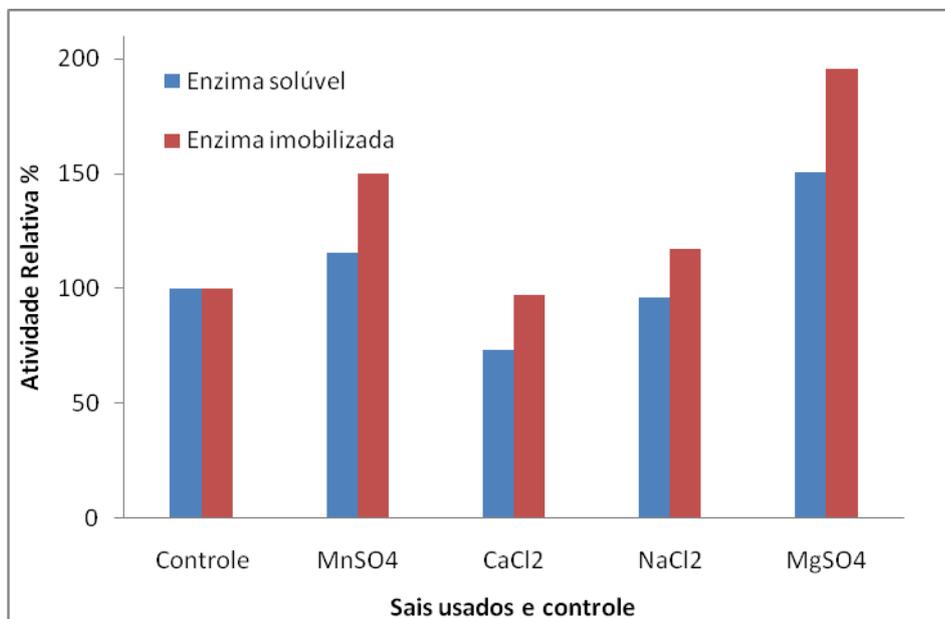
**Figura 10.** Valores experimentais pelo modelo de Michaelis-Menten para atividade enzimática em função da concentração de lactose ( $\beta$ -galactosidase livre e imobilizada).

O aumento dos valores de  $K_m$  com relação aos encontrados para a enzima livre (solúvel) pode ser explicado através da diminuição da afinidade da enzima pelo substrato que pode estar relacionada a fatores ligados ao processo de confinamento que ocorre ao se imobilizar a enzima, dessa forma a restrição dificulta o acesso do substrato ao local onde a enzima está ativa (KLEIN, et al. 2018). Jayakumar et al. (2011) observaram aumento de aproximadamente 2 vezes nos valores de  $K_m$  para urease imobilizada em alginato e quitosana e os valores de  $V_{max}$  mantendo sem alterações significativas. Os autores relataram que a difusão do substrato através da matriz do alginato exerceu a maior influência na cinética, onde a matriz muitas vezes impede a difusão livre do substrato e, portanto, resulta em  $K_m$  alterados. Com isso, o substrato leva mais tempo para chegar ao local da catálise e, portanto, resulta em um aumento de  $K_m$ . Quinn et al. (2001) analisaram os parâmetros cinéticos para a enzima  $\beta$ -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* em grafite, utilizando glutaraldeído como reagente de *cross-linking* (ligação cruzada). Os resultados do parâmetro cinético  $K_m$  para as enzimas livre e imobilizada foram de 1,74 mM e 9,34 mM.

### 5.3 Efeito da adição de sais sobre a atividade enzimática

Na Figura 11 são apresentados os resultados para o efeito da adição de sais sobre a atividade enzimática da enzima  $\beta$ -galactosidase de *A. oryzae* (Deslac<sup>®</sup>). Os sais podem atuar como cofatores enzimáticos e acelerar uma reação enzimática bem como atuarem como inibidores para algumas enzimas (ANSARI et al., 2018). Para que a catálise seja eficiente em um determinado processo pode ser interessante a proteção das enzimas da interação com o meio de reação, ou a sua fortificação através de uma rede combinante (ALPTEKIN et al., 2010).

A adição de sulfato de magnésio ( $MgSO_4$ ) 10 mM ao meio reacional apresentou um aumento na atividade em 195,76% para a enzima imobilizada e em 155,75% para a enzima livre. O magnésio atua como cofator ou ativador de mais de 300 enzimas, entre elas estão as enzimas hexoquinase e glicoquinase nas quais o magnésio é cofator e atua na fosforilação da glicose (JAYAKUMAR & BOSE, 2011). O magnésio está vitalmente ligado na síntese dos carboidratos e lipídios, atuando como catalisador considerado essencial de um amplo número de enzimas que incluem a  $\beta$ -galactosidase, tendo em vista que os ativadores aceleram as taxas da reação enzimática por promoverem o estado ativo do substrato ou da enzima (FERRER, et al., 2016).



**Figura 11** – Efeito da adição de sais sobre a atividade enzimática da enzima  $\beta$ -galactosidase de *A. oryzae* livre e imobilizada em alginato+pectina+glutaraldeído. Condições experimentais: as reações foram realizadas em tampão McIlvaine pH 5,0 a 40 °C para a enzima livre e em pH 6,5 a 45 °C para a enzima imobilizada.

O manganês também apresentou ativação da enzima livre e imobilizada (115,48% e 150,00%, respectivamente). O manganês pôde atuar tanto como ativador enzimático, como constituinte de metaloenzimas. Cloreto de sódio ( $\text{NaCl}_2$ ) apresentou aumento na atividade enzimática de 117,35% para a enzima imobilizada. Para a enzima livre houve uma redução da atividade enzimática (96,05%). Cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ) não influenciou a atividade enzimática, enquanto para a enzima livre houve redução da atividade enzimática (73,26%).

Tacin (2015) ao avaliar a imobilização da enzima álcool desidrogenase em suportes alginate-quitosana e glioxil-agarose conseguiu verificar que a adição de diferentes metais no ensaio com álcool desidrogenase, não foi observado efeito ativador na enzima livre. A enzima imobilizada foi ativada quando adicionados sais metálicos e promoveu um aumento da atividade com cloreto de potássio, sulfato de manganês e sulfato de magnésio. Aguiar-Oliveira (2007) avaliaram a adição de diferentes sais sobre a atividade da enzima frutossiltransferase de *Rhodotorula* sp. Neste estudo, a adição de sulfato de cobre apresentou ativação da enzima em 124%.

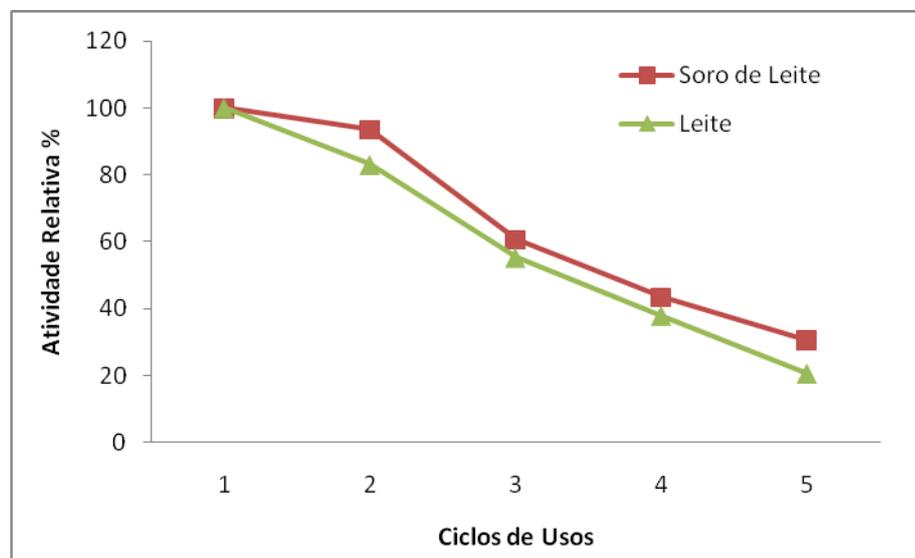
#### **5.4 Estabilidade de estocagem da enzima $\beta$ -galactosidase solúvel e imobilizada.**

Neste estudo, foram usadas as amostras da enzima  $\beta$ -galactosidase de *A. oryzae* (Deslac<sup>®</sup>) livre e imobilizada em alginato+pectina+glutaraldeído. A enzima foi armazenada a 10 °C durante 15 dias, visando avaliar a sua estabilidade à estocagem. Verificou-se que após 15 dias a enzima solúvel apresentou 21% da sua atividade enzimática inicial. Para a enzima imobilizada ao final dos 15 dias a atividade enzimática foi de 37%. Freitas (2013) observaram estabilidade ao incubar  $\beta$ -galactosidase livre durante 105 dias a 10° C e -4°C. Após 105 dias a enzima livre apresentou 30% e 7,2%, respectivamente, da sua atividade. Já a enzima imobilizada quando mantida no freezer por 90 dias, manteve 100% da sua atividade inicial.

Jochems et al. (2011) armazenaram a enzima  $\beta$ -galactosidase produzida por *K. lactis* livre e imobilizada a 5 °C. No estudo desses autores, eles observaram que a enzima solúvel apresentou 20% da sua atividade após 14 dias, enquanto a enzima imobilizada manteve 59% após o mesmo período de armazenamento.

## 5.5 Hidrólise do Soro de Leite e Leite Integral

As indústrias, principalmente a de alimentos, estão sempre a procura de enzimas que tenham altos índices de produtividade e estabilidade para que se possam ser usadas por repetidas vezes (KLEIN et al., 2018). A enzima  $\beta$ -galactosidase de *A. oryzae* (Deslac<sup>®</sup>) imobilizada em alginato+pectina+glutaraldeído foi submetida à hidrólise de soro de leite e leite tipo integral e reuso da enzima imobilizada (Figura 12). Para a hidrólise de soro de leite a enzima reteve 60% da atividade enzimática, enquanto para o leite integral a retenção de 55% após 3 ciclos, respectivamente. Este resultado dá-se como importante, principalmente para fins biotecnológicos industriais, tendo em vista que existe uma complexidade do uso industrial da  $\beta$ -galactosidase, por conta da sua instabilidade frente às adversidades do meio reacional e sua sensibilidade a mudanças durante os processos. Freitas (2013) avaliou a estabilidade de  $\beta$ -galactosidase de *K.lactis* imobilizada em quitosana e reticulada com glutaraldeído 0,8% na hidrólise da lactose. A enzima reteve 53% após 10 ciclos de bateladas a 40°C e pH 7,0.



**Figura 12** – Avaliação da hidrólise do leite e soro de leite e reuso da enzima  $\beta$ -galactosidase.

## 6. CONCLUSÃO

- No estudo de imobilização da enzima  $\beta$ -galactosidase de *A. oryzae* (Deslac®) o melhor derivado foi obtido com alginato (2% m/v), pectina (2% m/v) reticulada com glutaraldeído (25% v/v).
- O pH ótimo foi 5,0 e 6,5 respectivamente, para a hidrólise da lactose usando a enzima livre e imobilizada.
- A temperatura ótima foi de 45°C e 40°C, respectivamente, para hidrólise da lactose usando a enzima livre e imobilizada respectivamente.
- A enzima imobilizada produzida nesse estudo apresentou uma estabilidade de armazenamento em geladeira a 10°C de 60% em 10 dias.
- A utilização dos sais sulfato de cálcio e sulfato de magnésio, são viáveis a fim de potencializar a sua estabilidade e atividade enzimática.
- A enzima imobilizada se mostrou viável para utilização em escala industrial seguindo as condições experimentais.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR-OLIVEIRA, E. **Imobilização da enzima frutossiltransferase extracelular de *rhodotorula sp.* E aplicação na produção de frutooligossacarídeos.** 2007. 95f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas.

AHMEDI, A; ABOUSEOUD, M; ABDEL TIF, A; ANNABELLE, C. Effect of Diffusion on Discoloration of Congo Red by Alginate Entrapped Turnip (*Brassica rapa*) Peroxidase. **Enzyme Research.** v.5, p. 575-618, 2015.

ALMEIDA, K. N.; ALVIM, T.; SOUZA, A.; LACERDA, G.; ALVIM, F.; ALVIM, J. Hidrólise enzimática da lactose do permeado de soro de leite. **Revista do Instituto Laticínios Cândido Tostes**, v. 70, n. 2, p. 55-63, 2015.

ALVES, F. G. **Produção de  $\beta$ -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CCT7082 em fermentador e caracterização parcial da enzima livre e imobilizada.** Rio Grande, 2008. 96 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos). Universidade Federal do Rio Grande

ALPTEKIN, O.; TUKEL, S.S.; YILDIRIM, D.; ALAGOZ, D. Immobilization of catalase onto Eupergit C and its characterization. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 64, p. 177-183, 2010.

ANSARI, S.A.; AHMAD, S.I.; JAFRI, M.A.; NASSER, M.I.; SATAR, R. Utility of functionalized agarose nanoparticles in hydrolyzing lactose in batch reactors for dairy industries. **Química Nova**, São Paulo, v. 41, n. 4, p. 429-433, 2018.

ARAÚJO, L.R.; FALLEIROS, M. M.; de RESENDE, E. J. R. Estudo da estabilidade térmica de  $\beta$ -galactosidase imobilizada em duolite A568 por combinação dos métodos de imobilização, Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica, **Blucher Chemical Engineering Proceedings**, Volume 1, p. 1279-1284, 2015.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.71, n. 1, p. 248-254, 1976.

BRAGA, A. R. C.; GOMES, P. A.; KALIL, S. J. Formulation of culture medium with agroindustrial waste for  $\beta$ -galactosidase production from *Kluyveromyces marxianus* ATCC16045. **Food and Bioprocess Technology**, v. 5, p. 1-11, 2012.

BOSSO, A.; MORIOKA, L.R.I.; SANTOS, L.F.D.; SUGUIMOTO, H.H. Lactose hydrolysis potential and thermal stability of commercial  $\beta$ -galactosidase in UHT and skimmed milk. **Food Science and Technology**, v. 36, n. 1, 2016.

CABUK, B.; TARI, C.; HARSA, S.T.  $\beta$ -galactosidase immobilization on chitosan – hydroxyapatite complex: effects of immobilization conditions. Department of Food Engineering, **Izmir Institute of Technology**, USA, v.1, 2014.

CAMPELLO, G. S.; TRINDADE, R. A.; RÊGO, T. V.; BURKERT, J. F. M.; BURKERT, C. A. V. Immobilization of  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* on Eupergit<sup>®</sup> C and

Properties of the Biocatalyst. **International Journal of Food Engineering**, v. 8, p. 1-17, 2012.

CARDOSO, C.L.; MORAES, M. C.; CASS, Q. B. Imobilização de enzimas em suportes cromatográficos: uma ferramenta na busca por substâncias bioativas. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 1, p. 175-187, 2009.

CORGNEAU, M.; SCHER, J.; RITIE-PERTUSA, L.; LE, D.T.L.; PETIT, J.; NIKOLOVA, Y.; BANON, S.; GAIANI, C. Recent advances on lactose intolerance: tolerance thresholds and currently available answers. **Critical Review in Food Sciences and Nutrition**, v.15, p.3344-3356, 2017.

DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, G. M.; SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lípases imobilizadas em polímeros. **Química Nova**, v.27, n.4, p.623-630, 2014.

DARIF, S.P.A. **Estudo da imobilização de  $\beta$ -galactosidase de *Aspergillus oryzae*, *Kluyveromyces lactis* e *Saccharomyces marxianus* var *lactis* em matriz de alginato de cálcio, gelatina e transglutaminase**. 110 f. Dissertação de Mestrado em Ciência de Alimentos. Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2018.

DANTAS, A. **Imobilização e caracterização da lipase NS-40116 em poliestireno**. Dissertação de mestrado – Engenharia de Alimentos - Universidade Federal de Santa Catarina, 2017.

DWEVEDI, A.; KAYASTHA, A. M. Optimal immobilization of  $\beta$ -galactosidase from Pea (PsBGAL) onto Sephadex and chitosan beads using response surface methodology and its applications. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 2667-2675, 2009.

DEKER, P.J.T.; KOENDERS, D.; BRUINS, M.J. Lactose-Free Dairy Products: Market Developments, Production, Nutrition and Health Benefits. **Nutrients**, v. 11 n. 3, 2019.

FALLEIROS, L. N. S. S.; CABRAL, B. V.; FISCHER, J.; GUIDINI, C. Z.; CARDOSO, V. L.; RESENDE, M. M.; RIBEIRO, E. J. Improvement of recovered activity and stability of the *Aspergillus oryzae*  $\beta$ -galactosidase immobilized on duolite A568 by combination of immobilization methods. **Chemical Industry & Chemical Engineering Quarterly**, p.1-10, 2017.

FERRER, M.; MARTINEZ-MARTINEZ, M.; BARGIELA, R.; STREIT, W.R.; GOLSYSHINA O.V.; GOLYSHIN, P.N. Estimating the success of enzyme bioprospecting through metagenomics: current status and futures trends. **Microbial Biotechnology**, v.9.; p. 22-34, 2016.

FISCHER, J. **Hidrolise de lactose, por  $\beta$ -galactosidase de *Aspergillus oryzae* imobilizada em reator de leite fixo**. 2010. 136 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, Minas Gerais, 2010.

FRAMPTON, M. B.; ZELISKO, P. M. Chain length selectivity during the polycondensation of siloxane-containing esters and alcohols by immobilized *Candida antarctica* lipase B. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 58-59, p. 87-92, 2014.

FREITAS, F. F.; MARQUEZ, L. D. S.; RIBEIRO, G. P.; BRANDÃO, G. C.; CARDOSO, V. L.; RIBEIRO, E. J. A comparison of the kinetic properties of free and immobilized

*Aspergillus oryzae*β – Galactosidase. **Biochemical Engineering Journal**, v. 58-59, p. 33-38, 2011.

FREITAS, M. F. M. de. **Produção de β-galactosidase por *Kluyveromyces lactis* NRRL Y1564 em soro de leite e imobilização em quitosana**. 2013. 100 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química)-Centro de Tecnologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, 2013.

FERREIRA-ROCHA, L. O. **Utilização de soro lácteo, goma xantana e amido modificado na elaboração de doce de leite com café**. 2013. 204p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 2013.

FOX, P.E.; UNIACKE-LOWE, T.; MCSWEENEY, P.L.H.; O'MAHONY, J.A. Lactose. In: Dairy Chemistry and Biochemistry, pg. 21-68. Ed. **Springer International Publish**, Cham, 2015.

GÄNZLE; M.G.; HAASE, G.; JELEN, P. Lactose: crystallization, hydrolysis and value-added derivatives. **International Dairy Journal**, 18, p. 685–94, 2008.

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

GAVIRIA-ACOSTA, E.; Benetíz, R.; Ienis, L.; Concha, J. L. H. Optimización de la hidrólisis enzimática de proteínas presentes em semillas de Guandul (*Cajanus cajan*). **Biología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial**, v. 13, n. 2, p. 114-122, 2015.

GOMES, F.M; ARIELA, V.D. P; SILVA, S.D. G; CASTRO, F.H. Determinação das propriedades catalíticas em meio aquoso e orgânico da lipase de *Candida rugosa* imobilizada em celulignina quimicamente modificada por carbonildiimidazol. **Química Nova**. v. 29, n. 4, p. 710-718, 2006.

GURDAS, S.; GULEÇ A.; MUTULU, M. Immobilization of *Aspergillus oryzae* β-galactosidase onto duolite A568 resin via simple adsorption mechanism. **Food Bioprocess Technology**, v. 5, p. 904-911, 2012.

GUIMARÃES, P. M. R.; TEIXEIRA, J. A.; DOMINGUES, L. Fermentation of lactose to bioethanol by yeasts as part of integrated solutions for the valorisation of cheese whey. **Biotechnology Advances**, v.28, p. 375–384, 2015.

HAIDER, T.; HUSAIN, Q. Hydrolysis of milk/whey lactose β galactosidase: A comparative study of stirred batch process and packed bed reactor prepared with calcium alginate entrapped enzyme. **Chemical Engineering and Processing**, v. 48, p. 576-580, 2009

HERNAIZ, M. J.; CROUT, D. H. G. Immobilization/stabilization on Eupergit C of the β-galactosidase from *B. circulans* and an α-galactosidase from *Aspergillus oryzae*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, p. 26-32, 2010.

HEIDTMANN, R. B.; DUARTE, S. H.; PEREIRA, L. P.; BRAGA, A. R. C.; KALIL, S. J. Caracterização cinética e termodinâmica de β-galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 fracionada com sulfato de amônio. **Brazilian Journal of Food Technology** v. 15, n. 1, p. 1-9, 2012

HATZINIKOLAOU, D. G.; KATSIFAS, E.; MAMMA, D.; KARAGOUNI, A. D.; CHRISTAKOPOULOS, P.; KEKOS, D. Modelling of the simultaneous hydrolysis ultrafiltration of the whey permeate by a thermostable  $\beta$ -galactosidase from *Aspergillus niger*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 24, p. 161-172, 2005.

JAYAKUMAR, O.; BOSE, Z. R. Role of magnesium in alleviation of aluminium toxicity in plants, **Journal of Experimental Botany**, vol. 62, no. 7, pp. 2251–2264, 2011.

JAFARY, F.; PANJEHPOUR, M.; VARSHOSAZ, J.; YAGHMAEI, P. Stability improvement of immobilized alkaline phosphatase using chitosan nanoparticles. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 33, n. 02, p. 243-250, 2016.

JOCHEMS, P.; SATYAWALI, Y.; ROY, S.V.; DOYEN, W.; DIELS, L.; DEJONGHE, W. Characterization and optimization of  $\beta$ -galactosidase immobilization process on a mixed-matrix membrane. **Enzyme and Microbial Technology**, v.49, p. 580-588, 2011.

KESSI, E.; ARIAS, J. L. Using natural waste material as a matrix for the imobilization of enzymes: chicken eggshell membrane powder for  $\beta$ -galactosidase immobilization. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 187. n. 101. 2019.

KLEIN, M.P; SANT'ANA, V; HERTZ, P.F.R; COSTA, R; NIWOW, J.L. Kinetics and thermodynamics of thermal inactivation of  $\beta$ -Galactosidase from *Aspergillus oryzae*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 61, 2018.

KUMAR, S; HAQ, I; ABHAYRAJ, J.P. Improved enzyme properties upon glutaraldehyde cross-linking of alginate entrapped xylanase from *Bacillus licheniformis*. **International Journal of Biological Macromolecules**. v.98. p. 24-33, 2017

LADERO, M.; SANTOS, A.; GARCÍA – OCHA, F. Kinetic modeling of lactose hydrolysis with an immobilized  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. **Enzyme and Microbiology Technology**, v. 27, p. 583 – 592. 2012.

LI, L.; LI, G.; CAO, L. C.; REN, G. H.; KONG, W.; WANG, S. D.; LIU, Y. H. Characterization of the cross-linked enzyme aggregates of a novel  $\beta$ -galactosidase, a potential catalyst for the synthesis of galacto-oligosaccharides. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 63, p. 894–901, 2015.

LIMA, F.R.; ROCHA, L.O.F. Aproveitamento do soro de leite proveniente da produção do queijo do serro para fabricação de doce de leite: viabilidade econômica. **Revista Instituto Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 71, n. 2, p. 83-93, 2016.

LONGO, G. **Influência da adição de lactase na produção de iogurtes**. 2006. 89f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR. 2006.

MANERA, A.P.; ORES, J.C.; RIBEIRO, V.A.; BURKERT, C. A. V.; KALIL, S.J. Optimization of the culture medium for the production of  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082. **Food Technology and Biotechnology**, vol. 46, p. 66-72, 2008.

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

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

MORSCHBACHER, A.P.; VOLPATO, G.; SOUZA, C.F.V.D. *Kluyveromyces lactis*  $\beta$ -galactosidase immobilization in calcium alginate spheres and gelatin for hydrolysis of cheese whey lactose. **Ciência Rural**, v. 46, n. 5, p. 921-926, 2016.

MORTOZA, A.R. **Produção e purificação de beta-galactosidase expressa por fungo isolado do bioma cerrado brasileiro visando à aplicação como suplemento digestivo**. 2012. 71 f. Dissertação de mestrado em Ciências da Saúde – Universidade de Brasília, DF. 2012.

MULLER, J.M.; SANTOS, R.L.D.; BRIGIDO, R.V. Produção de alginato por microrganismos. **Polímeros**, São Carlos, v. 21, n. 4, p. 305-310, 2011.

NATH, A.; MONDAL, S.; CHAKRABORTY, S. BHATTACHARJEE, C.; CHOWDHURY, R. Production, purification, characterization, immobilization, and purification of  $\beta$ -galactosidase: a review. **Asia-Pacific Journal of Chemical Engineering**, v.9, p. 330-348, 2014.

NERYA E. W.; KUBOTA, L.T. Evaluation of enzyme immobilization methods for paper-based devices—A glucose oxidase study. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. Volume 117, n. 5, p. 551-559, 2016.

PANESAR, P. S.; KUMARI, S.; PANESAR, R. Potential application of immobilized  $\beta$ -galactosidase in food processing industries. **Enzyme Research**, v.2010, 16 p., 2010.

PARIZZI, P.C. **Imobilização de Beta-galactosidase em criogel supermacroporoso para hidrólise da lactose**. 2015. 72f. Dissertação de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, Minas Gerais. 2015.

PELEG, M. An empirical model for the description of moisture sorption curves. **Journal of Food Engineering**, v. 52, p. 1216-1219, 1988.

QUINN, Z.K.Z.; CHEN, X.D. Effects of temperature and pH on the catalytic activity of the immobilized  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 9, p. 33-40, 2001.

RODRIGUES, R.C.; ORTIZ, C.; BERENQUER-MURCIA, A. TORRES, R.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Modifying enzyme activity and selectivity by immobilization. **Chemical Society Reviews**, v. 42, p. 6290-6307, 2013.

ROSSETTO, B. P.; ZANIN, G. M.; DE MORAES, F. F. Determinação da atividade da enzima  $\beta$ -galactosidase por lactose do soro de queijo. **BBR-Biochemistry and Biotechnology Reports**, v. 1, p. 28–32, 2013.

SANGEETHA, P.T.; RAMESH, M. N.; PRAPULLA, S.G.; Fructooligosaccharide production using fructosyl transferase obtained from recycling culture of *Aspergillus oryzae* CFR 202. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 1085-1088, 2015.

SATAR, R.; ANSARI, S.A. Functionalized agarose as an effective and novel matrix for immobilizing *Cicer arietinum*  $\beta$ -galactosidase and its application in lactose hydrolysis. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 34, n. 2, p. 451-457, 2017.

SATAR, R; JAFRI, M.AI; RASOOL, M. ANSARI, S. A. Role of glutaraldehyde in imparting stability to immobilized  $\beta$ -Galactosidase systems. **Brazilian Archives Biology and Technology**, v. 60, e17160311, 2018.

SAQIB, S.; AKRAM, A.; HALIM, S.A.; TASSADUQ, R. Sources of  $\beta$ -galactosidase and its applications in food industry. **Biotech**, v.1, p.79, 2017.

SEKER, D.C; ZAIN, M.A.N. Response surface optimization of glucose production from liquid pineapple waste using immobilized invertase in PVA–alginate–sulfate beads. **Separation and Purification Technology**. v.33. p. 48-54. 2016.

SILVA-FILHO, R. R.Torralbo, D. F.;Di-Medeiros, M. C. B.; Batista, K. A.; Fernandes, K. F. Imobilização de lipase em pectina extraída de frutos de lobeira (*Solanum lycocarpum* St. Hil.). **BBR - Biochemistry and Biotechnology Reports**, [S.l.], v. 1, n. 1, p. 9-14, set. 2012.

SHELDON, R. A.; VAN PELT, S. Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 15, p. 6223-6235, 2013.

SOUZA, C.J.F.; GARCIA-ROJAS, E.E.; FAVARO-TRINDADE, C.S. Lactase ( $\beta$ -galactosidase) immobilization by complex formation: Impact of biopolymers on enzyme activity. **Food Hydrocolloids**, v.83 p. 88-96, 2018.

SOARES, M. S.; RICO, A. L. L.; ANDRADE, G. S. S.; CASTRO, H. F.; OLIVEIRA, P. C. Synthesis, characterization and application of a polyurethane-based support for immobilizing membrane-bound lipase. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, São Paulo, v. 34, n. 1, p. 29-39, 2017.

TACIN, M. V. **Imobilização da enzima álcool desidrogenase em suportes alginato-quitosana e glioxil-agarose**. 2015. 52 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, 2015.

TREVISAN, A.P.; **Influência de diferentes concentrações de enzimas lactase e temperaturas sobre a hidrólise lactose em leite pasteurizado**. 2008. 60 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria – RS, 2008.

TORRES, P.; BATISTA-VIERA, F. Immobilization of  $\beta$ -galactosidase from *Bacillus circulans* onto epoxy-activated acrylic supports. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 74, n. 3-4, p. 230-235, 2012.

TANRISEVEN, A.; DOGAN, S. A novel method for the immobilization of  $\beta$ galactosidase. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 27-30, 2016.

ZHOU, Q. Z. K.; CHEN, X. D. Effects of temperature and pH on the catalytic activity of the immobilized  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. **Biochemistry Engineering Journal** 9: 33 – 40. 2001.

WHITAKER, J. R. **Principles of Enzymology for the Food Sciences**. Zaragoza: Ed. Acribia, 1994.

