

UNIVERSIDADE REGIONAL INTEGRADA DO ALTO URUGUAI E DAS MISSÕES
– URI ERECHIM
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS

RAIELI SEGALLA

***SCREENING* DE SUPORTES PARA IMOBILIZAÇÃO DE β – GALACTOSIDASES
COMERCIAIS**

ERECHIM, RS
OUTUBRO DE 2015

RAIELI SEGALLA

**SCREENING DE SUPORTES PARA IMOBILIZAÇÃO DE β – GALACTOSIDASES
COMERCIAIS**

Dissertação de Mestrado apresentada como requisito parcial à obtenção do Grau de Mestre, pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos: Área de Concentração - Engenharia de Alimentos, Departamento de Ciências Agrárias da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI Erechim.

Orientadores: Prof^a. Dr^a. Geciane Toniazzo Backes
Prof^a. Dr^a. Eunice Valduga.

**ERECHIM, RS
OUTUBRO DE 2015**

**SCREENING DE SUPORTES PARA IMOBILIZAÇÃO DE β – GALACTOSIDASES
COMERCIAIS**

Raieli Segalla

Dissertação de Mestrado apresentada à Comissão Julgadora do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos, Área de Concentração: Engenharia de Alimentos.

Comissão Julgadora:

Prof^a. Dr^a. Geciane Toniazzo Backes
Orientador

Prof^a. Dr^a. Eunice Valduga
Orientador

Prof. Dr. Rogério Marcos Dallago
URI – Erechim

Prof^a. Dr^a. Giovana Cristina Ceni
UFSM

Erechim, Outubro de 2015

NESTA PÁGINA DEVERÁ SER INCLUÍDA A FICHA CATALOGRÁFICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO. ESTA FICHA SERÁ ELABORADA DE ACORDO COM OS PADRÕES DEFINIDOS PELO SETOR DE PROCESSOS TÉCNICOS DA BIBLIOTECA DA URI – ERECHIM.

“É enfrentando as dificuldades que você fica forte, é superando seus limites que você cresce, é resolvendo problemas que você desenvolve a maturidade, é desafiando o perigo que você descobre a coragem. Arrisque e descobrirá como as pessoas crescem quando exigem mais de si próprias.”

Roberto Shinyashiki

Oração de Santo Expedito

Meu Santo Expedito das causas justas e urgentes interceda por mim junto ao nosso senhor Jesus Cristo, socorra-me nesta hora de aflição e desespero, meu Santo Expedito, vós que sois um santo guerreiro, vós que sois o santo dos aflitos, vós que sois o santo dos desesperados, vós que sois o santo das causas urgentes, proteja-me. Ajuda-me, dai-me força, coragem e serenidade. Atenda meu pedido. Ajuda-me a superar estas horas difíceis, proteja-me de todos que possam me prejudicar, proteja minha família, atenda ao meu pedido com urgência. Devolva-me a paz e a tranquilidade. Meu Santo Expedito! Serei grato pelo resto de minha vida e levarei seu nome a todos que tem fé.

Essa conquista dedico, em especial aos meus alicerces, pai e mãe, e a todos aqueles que acreditaram nos meus sonhos e me incentivaram.

AGRADECIMENTOS

Inicialmente a Deus, por ter me concebido à vida e ter tornado esse sonho possível.

À minha família, em especial aos meus pais, Janice e Loreni, pelo estímulo, apoio, amor, dedicação e por sempre serem meus pilares nos momentos mais difíceis. Por representar o exemplo de determinação, força e humildade que vou levar para sempre.

Aos meus irmãos Kéller e Franciéli, e ao meu cunhado Josimar, pelo incentivo, ajuda e apoio em todos os momentos.

Ao meu namorado William, obrigada pelo carinho, auxílio e paciência nesta etapa tão importante e por sempre acreditar em mim.

Às professoras Geciane Toniazzo Backes e Eunice Valduga, pela orientação, estímulo, paciência, compreensão e amizade. Muito obrigada!

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da URI-Erechim, em especial aos professores Rogério Marcos Dallago e Jamile Zeni, pelos ensinamentos, paciência e incansáveis explicações.

Às minhas amigas Márcia, que muito me auxiliou, Sandi, Valéria e Nádia, sempre prontas para ajudar e esclarecer minhas dúvidas, além das conversas e descontração.

Em especial agradecer às minhas grandes amigas Cindy, pela parceria, dedicação, pelos ensinamentos repassados, pela paciência de me auxiliar e explicar, por ser uma “mãezona”; você sempre será um exemplo para mim, te admiro muito! E a Aline Rigo, pela força, amizade, pelos conselhos e pelo ombro amigo. Por me auxiliar nos cálculos matemáticos. Muito obrigada!

Aos demais colegas e amigos dos Laboratórios de Biotecnologia de Alimentos e Termodinâmica, que de uma forma ou outra sempre estiveram à disposição para me ajudar.

Aos meus chefes, amigos e colegas de trabalho da Prefeitura Municipal de Erechim – Secretaria de Cidadania, obrigada pelo apoio e pelo incentivo, em especial à Dianair, Giana, Fabrício e Luísa por escutar os meus desabafos e se tornarem tão grandes amigos.

Às professoras do Curso de Nutrição da URI – Erechim, pelo apoio e incentivo.

À URI- Erechim, que forneceu todas as ferramentas para a realização deste trabalho e disponibilizou horários fora do expediente.

À FAPERGS pelo apoio financeiro.

À banca avaliadora, que aceitaram prontamente o convite, mesmo no curto espaço de tempo.

A todos que não citei, mas que de alguma forma fizeram parte deste trabalho.

Muito obrigada!

Resumo da Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos como parte dos requisitos necessários para a obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos.

SCREENING DE SUPORTES PARA IMOBILIZAÇÃO DE β – GALACTOSIDASES COMERCIAIS

Raieli Segalla

Outubro, 2015

Orientadores: Prof^ª. Dr^ª. Geciane Toniazzo Backes

Prof^ª. Dr^ª. Eunice Valduga

Resumo: O trabalho teve por objetivo realizar um *screening* de suportes para a imobilização de β – galactosidase comercial de *Kluyveromyces lactis* e *Aspergillus oryzae* em matrizes de alginato/gelatina/fostato de cálcio (AGPCa), alginato de sódio e carvão ativado, poliuretano (PU) e poli(hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) (PHBV), bem como a caracterização, avaliação dos rendimentos, estabilidade e reuso. Na caracterização parcial das enzimas livres o tempo de reação, pH e temperatura ótimos e parâmetros cinéticos (K_m e $V_{m\acute{a}x}$), com ONPG, foram de 5 min, 7,0 e 16°C (597,13 U/mL), K_m 7,58 mM e $V_{m\acute{a}x}$ 833,33 U/mL; e 20 min, 5,0 e 50°C (14,83 U/mg), K_m 1,83 mM e $V_{m\acute{a}x}$ 24,39 U/mg, para a enzima de *K. lactis* e *A. oryzae*, respectivamente. Os melhores resultados ocorreram com o suporte PHBV para a β – galactosidase de *K. lactis* e de PU para a de *A. oryzae*. No primeiro, a enzima diluída em tampão fostato de sódio 100 mM pH 7,0 apresentou cerca de 458 U/g e 5 % de rendimento de imobilização. Para a β – galactosidase de *A. oryzae* em 0,005 g de enzima, tempo de reação de 7 min, quantidades de 0,05 g da matriz imobilizada e 2,5 ml do substrato para a medida de atividade, apresentaram cerca de 14 U/g e rendimento superior a 75 %. O pH e temperatura ótimos da enzima de *A. oryzae* não foram afetados pelo processo de imobilização e foi possível 3 ciclos, com 40% de atividade residual a 40 e 50°C. A estabilidade, avaliada nas temperaturas de 4 e 22 °C apresentou atividade relativa superior a 80% após 46 dias.

Palavras-chave: *Screening*, Imobilização, β – galactosidase.

Dissertation summary presented to the Graduate Program in Food Engineering as part of the requirements for obtaining the Master's Degree in Food Engineering.

SCREENING OF β – GALACTOSIDASE SUPPORTS FOR COMMERCIAL FOR DETENTION

Raieli Segalla

October, 2015

Advisors: Prof^a. Dr^a. Geciane Toniazzo Backes

Prof^a. Dr^a. Eunice Valduga

Resumo: Abstract: This study aimed to conduct a screening brackets for immobilization β - commercial galactosidase *Kluyveromices lactis* and *Aspergillus oryzae* in matrices of alginate/gelatin/calcium phosphate (AGPCa), sodium alginate and activated carbon, polyurethane (PU) and poly (hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) (PHBV), as well as the characterization, assessment of income, stability and reuse. In partial characterization of free enzymes the reaction time, pH and temperature optimum and kinetic parameters (V_{max} and K_m) with ONPG were 5 min, 7.0 and 16 °C (597.13 U/ml), K_m 7.58 mM and V_{max} 833.33 U/ml; and 20 min, 5,0 and 50 °C (14.83 U / mg) V_{max} and K_m 1.83 mM 24.39 U/mg for the enzyme *K. lactis* and *A. oryzae*, respectively. Best results occurred with the support for the PHBV β - galactosidase *K. lactis* and PU for *A. oryzae*. At first the enzyme diluted in sodium phosphate buffer 100 mM pH 7.0 showed about 458 U/g 5% immobilization yield. For β - galactosidase from *A. oryzae* enzyme 0.005 g, 7 min reaction time, amounts of 0.05 g of the immobilized matrix and 2.5 ml of the substrate to measure the activity, showed about 14 U/g efficiency greater than 75%. The pH and temperature optima of the *A. oryzae* enzyme was not affected by the immobilization process and it was possible 3 cycles, with a 40% residual activity at 40 and 50 ° C. The stability, assessed at temperatures of 4 and 22 ° C showed higher relative activity of 80% after 46 days.

Keywords: Screening, Immobilization, β – galactosidase.

LISTA DE SIGLAS

% - Percentual;

AGPCa – Matriz polimérica – inorgânica de alginato, gelatina e fosfato de cálcio;

AH₂O – Matriz polimérica – inorgânica de alginato e água;

Ca⁺ – cálcio;

CaCl₂ – Cloreto de cálcio;

DCCR – Delineamento Central Composto Rotacional;

DP – Desvio Padrão;

EC – *Enzyme Commission*;

ES – Complexo enzima substrato;

F_{cal} – F calculado;

FDA – *Food and Drug Administration*;

F_{tab} – F tabelado;

g – Gramas;

g/L – Gramas por litro;

GOS – Galacto-oligosacarídeos;

GRAS – *Generally Recognized as Safe*;

H⁺ – Hidrogênio;

h – Horas;

IUBMB- União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular;

kJ- Kilojoule;

K_m – Constante de Michaelis – Menten;

L – Litro;

m/v – Massa por volume;

Mg⁺ – Magnésio;

mg – Miligramas;

min – Minutos;

mL – Mililitro;

mL/L – mililitro por litro;

MM – Massa molecular;

mm – Milímetro;
mM – Milimolar;
mM/min – Milimolar por minuto;
Na⁺ – Sódio;
NLU – quantidade de enzima para formar 1,30 μmol de ONP, nas condições do ensaio
°C – Graus Celsius;
ONP – o – nitrofenol;
ONPG – *o-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside*;
pH – Potencial hidrogeniônico;
PHBV- Poli(hidroxibutirato-co-hidroxivalerato);
PU – Poliuretano;
R – Coeficiente de correlação;
R (%) – Percentual de recuperação;
RI (%) – Rendimento de imobilização;
rpm – Rotação por minuto;
s – Segundos;
T – Temperatura;
U – Unidades de atividade enzimática (μmol/min);
v/v – Volume por volume;
V_{máx} - Velocidade máxima;
μ – Micro;
μmol – Micromolar.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Rotas enzimáticas de conversão da lactose por β – galactosidase.....	24
Figura 2 – Métodos para imobilização de enzimas.....	29
Figura 3 – Modelo “Egg-box” da estrutura do gel de alginato com íons de cálcio.....	37
Figura 4 – Esquema representativo das etapas para formação da espuma de PU.....	40
Figura 5 – Ilustração dos principais materiais do suporte de imobilização: (a) Alginato de sódio; (b) Gelatina.....	53
Figura 6 – Fluxograma do processo de imobilização da enzima β – galactosidase em matriz de AGPCa.....	53
Figura 7 – Representação esquemática do processo de formação das esferas do suporte de AGPCa (a) e do controle AH_2O (b).....	54
Figura 8 – Ilustração do material do suporte de imobilização: carvão ativado.....	57
Figura 9 – Fluxograma do processo de imobilização da enzima β – galactosidase em matriz de alginato de sódio e carvão ativado.....	57
Figura 10 – Ilustração do principal material do suporte de imobilização: PHBV purificado.....	58
Figura 11 – Fluxograma do processo de imobilização da enzima β – galactosidase em matriz de PHBV.....	59
Figura 12 – Apresentação dos monômeros usados na elaboração da espuma de PU, (a) polioliol e (b) isocianato.....	60
Figura 13 – Fluxograma do processo de imobilização da enzima β – galactosidase de <i>K. lactis</i> / <i>A. oryzae</i> em matriz de PU.....	61
Figura 14 – Divisão das partes do suporte já impregnado com a enzima β – galactosidase comercial de <i>A. oryzae</i>	62
Figura 15 – Superfícies de resposta (a) e (c) e curvas de contorno (b) e (d) para a atividade de β – galactosidase livre de <i>K. lactis</i> (U/mL) e <i>A. oryzae</i> (U/mg), obtidas em função do pH e a temperatura ($^{\circ}C$).....	70

Figura 18 – Aspecto das esferas de β – galactosidase imobilizada em AGPCa armazenada em solução tampão acetato de potássio 100 mM pH 6,8 (a) e sem o tampão (b), a 4°C.....	76
Figura 19 – Aspecto das esferas de β – galactosidase imobilizada em AGPCa após a reação de medida de atividade do planejamento fatorial DCCR 2 ²	79
Figura 20 – Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para atividade de β – galactosidase imobilizada de <i>K. lactis</i> (U/g), obtida em função da concentração de alginato de sódio e CaCl ₂	80
Figura 21 – Aspecto visual de formação de cor empregando diferentes sais (75 mM) na reação de hidrólise com ONPG (a) e utilizando cloreto de manganês em diferentes molaridades (100 a 1000 mM) (b).	83
Figura 22 – Ilustração das esferas de alginato de sódio e carvão ativado imobilizadas (a), e reação de hidrólise (b) utilizando a β – galactosidase de <i>K. lactis</i>	85
Figura 23 – Ilustração do suporte de imobilização em PU com a enzima impregnada (a), e reação de hidrólise (b) utilizando a β – galactosidase de <i>K. lactis</i>	86
Figura 24 – Ilustração do suporte de imobilização de PHBV com a enzima β – galactosidase de <i>K. lactis</i> impregnada.....	87
Figura 25 – Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para atividade de β – galactosidase imobilizada de <i>A. oryzae</i> (U/g), obtida em função do pH e a temperatura (°C).....	93
Figura 26 – Reciclos de utilização de β – galactosidase de <i>A. oryzae</i> imobilizada em suporte de PU nas temperaturas de 40 e 50°C.	94
Figura 27 – Estabilidade da β – galactosidase de <i>A. oryzae</i> imobilizada em suporte de PU nas temperaturas de 4 e 22 °C.	95
Figura 16 – Linearização utilizando o modelo de Lineweaver-Burk dos dados de atividade de β – galactosidase comercial livre (U/mL), oriunda de <i>K. lactis</i> , em relação à concentração do substrato ONPG (mM).	115
Figura 17 – Linearização utilizando o modelo de Lineweaver-Burk dos dados de atividade de β – galactosidase comercial livre (U/mg), oriunda de <i>A. oryzae</i> , em relação à concentração do substrato ONPG (mM).	115

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Características de β – galactosidases expressas por micro-organismos.....	25
Quadro 2 – Vantagens e desvantagens dos cinco métodos básicos de imobilização de enzimas.....	31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Variáveis e níveis utilizados no DCCR (2^2), para a atividade de β – galactosidase livre oriunda de <i>K. lactis</i>	51
Tabela 2 – Variáveis e níveis utilizados no DCCR (2^2), para a atividade de β – galactosidase livre oriunda de <i>A. oryzae</i>	52
Tabela 3 – Variáveis e níveis utilizados no DCCR (2^2), para a atividade de β – galactosidase imobilizada na matriz de AGPCa.....	56
Tabela 4 – Estudo do tempo de reação da enzima β – galactosidase comercial livre de <i>K. lactis</i> e <i>A. oryzae</i> , pelas unidades de absorbância.	68
Tabela 5 – Matriz do planejamento fatorial completo DCCR 2^2 (valores codificados e reais) e a resposta de atividade de β – galactosidase, para a caracterização parcial das enzimas livres, de <i>K. lactis</i> e de <i>A. oryzae</i>	69
Tabela 10 – Atividade de β – galactosidases livres de <i>K. lactis</i> (U/mL) e <i>A. oryzae</i> (U/mg), em função da concentração do substrato ONPG (mM).	72
Tabela 11 – Valores de K_m e $V_{m\acute{a}x}$ para a atividade da enzima β – galactosidase livre de <i>K. lactis</i> e <i>A. oryzae</i>	73
Tabela 12 – Quantidade de β – galactosidase para imobilização em suporte de AGPCa, atividade (U/g), rendimento (%) e recuperação (%).	74
Tabela 13 – Atividade, rendimento e recuperação de β – galactosidase de <i>K. lactis</i> imobilizada em suporte de AGPCa e em AH_2O	75
Tabela 14 – Tempo de reação para a atividade de β – galactosidase de <i>K. lactis</i> imobilizada em suporte de AGPCa.	76
Tabela 15 – Matriz do planejamento fatorial completo DCCR 2^2 (valores codificados e reais) e a resposta de atividade de β – galactosidase imobilizada de <i>K. lactis</i> (U/g).....	78
Tabela 18 – Tempo de reação para a atividade de β – galactosidase de <i>K. lactis</i> imobilizada em suporte de AGPCa.	81

Tabela 19 – Atividade de β – galactosidase de <i>K. lactis</i> (U/mL) avaliada com alginato de sódio, gelatina, CaCl ₂ e tampão fosfato de potássio 100 mM pH 7,5.....	81
Tabela 20 – Estudo qualitativo da influência dos sais na atividade de β – galactosidase de <i>K. lactis</i>	82
Tabela 21 – Atividade, rendimento e recuperação de β – galactosidase de <i>K. lactis</i> imobilizada em suporte de PHBV.....	87
Tabela 22 – Quantidade de β -galactosidase de <i>A. oryzae</i> utilizada para a imobilização em PU, atividade (U/g) e rendimento de imobilização (%)......	88
Tabela 23 – Quantidade de suporte imobilizado e substrato (ONPG) adicionados para efetuar a medida de de atividade de β -galactosidase de <i>A. oryzae</i> imobilizada em matriz de PU.	89
Tabela 24 – Tempo de reação para a atividade de β – galactosidase de <i>A. oryzae</i> imobilizada em matriz de PU, em unidades de absorvância (410 nm) e atividade enzimática (U/g). 90	
Tabela 25 – Avaliação da distribuição de β – galactosidase na estrutura da matriz de PU, por corte longitudinal individual.	91
Tabela 26 – Avaliação da distribuição de β – galactosidase na estrutura da matriz de PU, por quadrante individual.....	91
Tabela 27 – Matriz do planejamento fatorial completo DCCR 2 ² (valores codificados e reais) e a resposta de atividade de β – galactosidase (U/g), para a caracterização parcial da enzima imobilizada de <i>A. oryzae</i>	92
Tabela 6 – Coeficiente de regressão, erro padrão, valores de p e t do planejamento fatorial completo DCCR 2 ² para atividade enzimática de β – galactosidase livre de <i>K. lactis</i> (U/mL).....	111
Tabela 7 – Coeficiente de regressão, erro padrão, valores de p e t do planejamento fatorial completo DCCR 2 ² para atividade enzimática de β – galactosidase livre de <i>A. oryzae</i> (U/mg).	111
Tabela 8 – Análise de variância – ANOVA, para atividade enzimática de β – galactosidase livre de <i>K. lactis</i> (U/mL).	112

Tabela 9 – Análise de variância – ANOVA, para atividade enzimática de β – galactosidase livre de <i>A. oryzae</i> (U/mg).....	112
Tabela 16 – Coeficiente de regressão, erro padrão, valores de p e t do planejamento fatorial completo DCCR 2 ² para atividade enzimática de β – galactosidase imobilizada de <i>K. lactis</i> (U/g) em suporte de AGPCa.	113
Tabela 17 – Análise de variância – ANOVA, para atividade enzimática de β – galactosidase imobilizada de <i>K. lactis</i> (U/g), em suporte de AGPCa.	113
Tabela 28 – Coeficiente de regressão, erro padrão, valores de p e t do planejamento fatorial completo DCCR 2 ² para atividade enzimática de β – galactosidase imobilizada de <i>A. oryzae</i> (U/g), em suporte de PU.....	114
Tabela 29 – Análise de variância – ANOVA, para atividade enzimática de β – galactosidase imobilizada de <i>A. oryzae</i> (U/g), em suporte de PU.....	114

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
2.1 β – GALACTOSIDASE	23
2.2 IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS	27
2.2.1 Alginato	37
2.2.2 Gelatina	38
2.2.3 Poliuretano	39
2.2.4 Carvão ativado.....	41
2.2.5 Poli(hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) (PHBV)	42
2.3 APLICAÇÕES DA ENZIMA β – GALACTOSIDASE	43
2.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	47
3 MATERIAL E MÉTODOS	48
3.1 MATERIAL.....	48
3.1.1 Equipamentos	49
3.2 MÉTODOS	50
3.2.1 Caracterização de β – galactosidase livre.....	50
3.2.1.1 Tempo de reação.....	51
3.2.1.2 pH e temperatura ótimos.....	51
3.2.1.3 Determinação dos parâmetros cinéticos $V_{m\acute{a}x}$ e K_m	52
3.2.2 Imobilização em matriz de alginato/ gelatina/ fosfato de cálcio (AGPCa)	52
3.2.2.1 Tempo de reação para a dosagem de atividade de β – galactosidase imobilizada	55
3.2.2.2 Delineamento experimental de imobilização para alginato de sódio e $CaCl_2$..	56
3.2.3 Imobilização em suporte de alginato de sódio e carvão ativado	56
3.2.4 Imobilização em suporte de poli(hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) (PHBV)	58
3.2.5 Imobilização em suporte de poliuretano (PU)	60
3.2.5.1 Tempo de reação para a dosagem de atividade de β – galactosidase imobilizada	62

3.2.5.2	Avaliação da distribuição de β – galactosidase na estrutura do suporte de PU	62
3.2.5.3	pH e temperatura da enzima imobilizada	63
3.2.5.4	Reutilização de β – galactosidase imobilizada em suporte de PU	63
3.2.5.5	Estabilidade de β – galactosidase imobilizada em suporte de PU	63
3.2.6	Rendimento da imobilização (RI)	64
3.2.7	Determinações analíticas	65
3.2.7.1	Atividade de β – galactosidase	65
3.2.7.2	pH	66
3.3	ANÁLISE ESTATÍSTICA	66
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	67
4.1	CARACTERIZAÇÃO De β – GALACTOSIDASES LIVRES	67
4.1.1	Tempo de reação	67
4.1.2	pH e temperatura ótimos	68
4.1.3	Determinação dos parâmetros cinéticos $V_{m\acute{a}x}$ e K_m	71
4.2	IMOBILIZAÇÃO DE β – GALACTOSIDASE DE <i>K. lactis</i>	74
4.2.1	Matriz de alginato/ gelatina/ fosfato de cálcio (AGPCa)	74
4.2.1.1	Tempo de reação para a dosagem de atividade de β – galactosidase imobilizada	76
4.2.1.2	Efeitos de diferentes tampões na imobilização	77
4.2.1.3	Delineamento experimental de imobilização para alginato de sódio e $CaCl_2$	77
4.2.1.4	Tempo de reação para a dosagem de atividade de β – galactosidase imobilizada em AGPCa sob condições otimizadas	80
4.2.1.5	Efeito dos componentes do suporte de imobilização (AGPCa) na atividade da enzima	81
4.2.2	Suporte de alginato de sódio e carvão ativado	84
4.2.3	Imobilização em suporte de poliuretano (PU)	85
4.2.4	Imobilização em suporte de poli(hidroxitirato-co-hidroxicincoano) (PHBV)	87
4.3	IMOBILIZAÇÃO DE β – GALACTOSIDASE DE <i>A. oryzae</i>	88
4.3.1	Imobilização em suporte de poliuretano (PU)	88
4.3.1.1	Tempo de reação para a dosagem de atividade de β – galactosidase imobilizada	89

4.3.1.2 Avaliação da distribuição de β – galactosidase imobilizada na estrutura do PU	90
4.3.1.3 pH e temperatura ótimos da enzima imobilizada	92
4.3.1.4 Reutilização de β – galactosidase imobilizada	94
4.3.1.5 Estabilidade de β – galactosidase imobilizada	95
5 CONCLUSÕES.....	97
5.1 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	98
REFERÊNCIAS	99
APÊNDICE A	111
APÊNDICE B.....	115

1 INTRODUÇÃO

A tecnologia enzimática é uma alternativa que visa substituir os processos químicos, envolvendo menor impacto ambiental e mais especificidade, apresentando-se como uma ferramenta promissora para síntese de compostos de maior valor agregado. Desta forma, o interesse pelo uso de enzimas vem aumentando nos últimos anos, devido ao fato da preocupação com questões ambientais, qualidade do produto e redução de custos operacionais (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006).

As enzimas geralmente atuam em condições brandas de temperatura, pH e pressão, atingindo velocidades de reação consideravelmente superiores às obtidas na presença de catalisadores químicos convencionais. Sua elevada especificidade permite reduzir a quantidade de resíduos gerados, garantindo maior rendimento do processo e consequente vantagem econômica (MENDES *et al.*, 2011).

A enzima β – galactosidase, popularmente conhecida como lactase (E.C.3.2.1.23), atua na hidrólise da lactose, para obtenção de produtos com baixo teor deste açúcar; na produção de galacto-oligosacarídeos (GOS); na melhoria da qualidade sensorial de produtos como doce de leite, sorvete e leite condensado; na melhor biodegradabilidade do soro de queijo, entre outros (MLICHOVÁ; ROSENBERG, 2006; VIEIRA, 2009; KLEIN, 2010; PANESAR; KUMARI; PANESAR, 2010; FAI; PASTORE, 2015).

Desta forma, as lactases pertencem ao grupo de biocatalisadores cuja imobilização tem despertado crescente interesse, devido ao amplo potencial de aplicação na indústria de alimentos (KLEIN, 2010). A imobilização apresenta-se como uma alternativa atraente, pois possibilita produzir biocatalisadores mais estáveis e com boa especificidade ao substrato, eliminando assim, algumas restrições do uso das enzimas em processos industriais (ZANIN; MORAES, 2004).

Na imobilização, entre outras características, o catalisador homogêneo, perdido após a reação, torna-se um catalisador heterogêneo, separável do meio reacional, com maior estabilidade e reutilizável, permitindo que o processo biotecnológico seja economicamente viável (DATTA; CHRISTENA; RAJARAM, 2013).

No processo de imobilização, além de facilitar a separação do meio reacional, não há contaminação do produto final pela enzima. Na maioria dos casos há melhoria de sua estabilidade operacional e térmica e permite o desenvolvimento de sistemas de operação contínua. Assim, numerosas técnicas e suportes têm sido desenvolvidos para aperfeiçoar a imobilização de enzimas e otimizar a sua aplicação (GROSOVÁ; ROSENBERG; REBROŠ, 2008).

As técnicas são desenvolvidas, pois não há um método de imobilização universal, aplicável a todos os biocatalisadores. Isto se deve às diferentes características, composição química, propriedades do substrato, do produto e finalidade de aplicação do produto obtido. Dessa forma é necessário escolher o procedimento mais simples e barato, resultando em boa imobilização, retenção de atividade e alta estabilidade operacional (CAO, 2005).

Tendo em vista as vantagens da utilização de enzimas imobilizadas e o potencial de aplicação das mesmas como biocatalisadores em reações de interesse, têm-se a consolidação da proposta deste estudo. Neste contexto, o mesmo teve como objetivo, imobilizar β -galactosidases comerciais em diferentes suportes, afim de, avaliar o comportamento das enzimas e a eficiência dos métodos utilizados, destes, considerando a caracterização parcial, rendimento, estabilidade e reciclo.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo será apresentada uma breve revisão sobre a enzima β – galactosidase, bem como, a sua aplicação em reações de interesse. Posteriormente será discutido sobre a imobilização enzimática, sendo abordada de forma mais detalhada os diferentes suportes utilizados no estudo. Envolvendo, neste caso, as técnicas encapsulamento por geleificação iônica do alginato de sódio, com gelatina e carvão ativado, imobilização em poliuretano (PU) e por adsorção, utilizando a técnica de Poli(hidroxibutirato-co-hidrovalerato) (PHBV). Ainda, serão apresentadas informações a respeito da imobilização de β – galactosidases, com ênfase às enzimas oriundas de *Kluyveromices lactis* e *Aspergillus oryzae*.

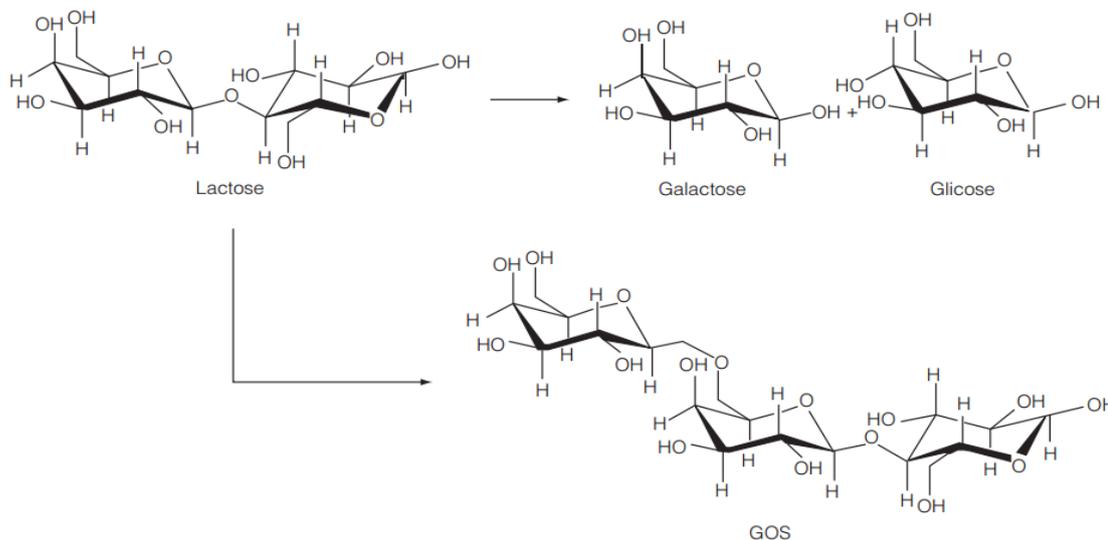
2.1 β – GALACTOSIDASE

A enzima β – galactosidase, popularmente conhecida como lactase (E.C. 3.2.1.23) é classificada como uma hidrolase, com capacidade de transferase para grupos galactosil. Catalisa o resíduo terminal β – galactopiranosil da lactose (Gal β 1 – 4Glc) para formar glicose e galactose, dois monossacarídeos mais doces, mais solúveis e mais digestivos do que a lactose (HOLSINGER, 1997; TANRISEVEN; DOGAN, 2002; ELNASHAR; KAHIL, 2014). Também realiza a transgalactosilação da galactose, gerando GOS, os quais favorecem o crescimento bacteriano da microflora intestinal (JURADO *et al.*, 2002; TOMAL *et al.*, 2010; KLEIN *et al.*, 2012). Quando o aceptor é a água, ocorre a formação de galactose por hidrólise. Quando o aceptor é um açúcar, o resultado é a formação de galacto-oligossacarídeos (FREITAS, 2007; TOMAL *et al.*, 2010). A Figura 1 apresenta as rotas enzimáticas de conversão da lactose pela enzima β – galactosidase (MARTINS; BURKERT, 2009).

A lactase pode ser encontrada em plantas (pêssegos, amêndoas, brotos de alfafa e rosas selvagens), organismos animais (pele, intestinos e cérebro), bactérias, leveduras, fungos e a partir de fontes recombinantes. Suas características e condições operacionais de temperatura e pH variam conforme a sua origem. Muito embora, nem todas as β –

galactosidases podem ser utilizadas na indústria alimentícia (GEKAS; LÓPEZ-LEIVA, 1985; FREITAS, 2007; HUSAIN, 2010).

Figura 1 – Rotas enzimáticas de conversão da lactose por β – galactosidase.



Fonte: Martins e Burkert (2009).

De acordo com Gékas e López-Leiva (1985) e Freitas (2007), as possíveis fontes de lactases microbianas mais conhecidas são:

- Leveduras: *Saccharomyces sp.*, *K. lactis*, *Kluyveromices marxianus*, *Cândida pseudotropicalis*, *Brettanomyces anomalis* e *Wingea roberstii*.

- Fungos: *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *A. oryzae*, *Aspergillus phoenus*, *Mucor pusillus*, *Mucor miehei*, *Alternaria palmi*, *Curvalaria anaequalis*, *Fusarium moniliforme* e *Alternaria alternara*.

- Bactérias: *Escherichia coli*, *Bacillus megaterium*, *Thermus aquaticus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus helveticus*, *Bacillus sp.* e *Lactobacillus sporogenes*.

De acordo com o exposto, existem várias fontes de lactase. Neste caso, quando as aplicações envolvem sistemas alimentares, é mais aconselhado trabalhar com enzimas geralmente reconhecidas como seguras (TREMARIN, 2007). A legislação brasileira estabelece por meio da Resolução RDC nº 205/2006, que a enzima lactase utilizada na indústria de alimentos deve ser de origem microbiana, proveniente dos micro-organismos: A.

niger, *A. oryzae*, *A. oryzae* expresso em *A. niger*, *Candida pseudotropicalis*, *K. lactis*, *K. fragilis*, *K. marxianus*, *Saccharomyces* sp. (BRASIL, 2006).

O status GRAS (*Generally Recognized as Safe*) é uma designação do FDA (*Food and Drug Administration*) para substâncias químicas ou aditivos seguros, adicionados ao alimento. Atualmente, o status GRAS é válido somente para espécies do gênero *Aspergillus* e *Kluyveromyces*, porque essas enzimas já tem um histórico de uso, sendo submetidas a numerosos testes (TREMARIN, 2007; HUSAIN, 2010).

A enzima oriunda de *K. lactis* tem um pH ótimo próximo ao do leite e apresenta atividade considerável entre 4 e 6, tornando-a adequada para o tratamento de leite antes do consumo. A β – galactosidase de *A. oryzae* apresenta um pH ótimo de 5,0 e uma temperatura ideal entre 50 e 55°C, o que a torna funcional no ambiente ácido do estômago. As lactases de *K. fragilis* e de *A. niger*, com um pH ótimo entre 4 e 4,5 e temperatura ótima de 55°C, são adequadas para a hidrólise da lactose em soro ácido (HOLSINGER, 1997). No Quadro 1 encontra-se a descrição de algumas características da enzima β – galactosidase proveniente de micro-organismos.

Quadro 1 – Características de β – galactosidases expressas por micro-organismos.

Fontes	pH ótimo	Temperatura ótima (°C)	Cofatores necessários	Inibidores iônicos
<i>Aspergillus níger</i>	3,0 – 4,0	55 – 60	Nenhum	Nenhum
<i>Aspergillus oryzae</i>	5	50 – 55	Nenhum	Nenhum
<i>Kluyveromyces fragilis</i>	6,6	37	Mg, Mn, K	Ca, Na
<i>Kluyveromyces lactis</i>	6,9 – 7,6	35	Mg, Mn, K	Ca, Na
<i>Echerichia coli</i>	7,2	40	Mg, Na, K	n.d
<i>Bacillus circulans</i>	6	60 – 65	Nenhum	n.d
<i>Bacillus sp.</i>	6,8	65	n.d	n.d
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	7	42 – 45	n.d	n.d
<i>Lactobacillus thermophilus</i>	6,2 – 7,1	55 – 57	Mg	n.d
<i>Streptococcus thermophilus</i>	6,5 – 7,5	55	Na, K, Mg	Ca
<i>Mucor pusillus</i>	4,5 – 6,0	60	n.d	n.d
<i>Thermus aquaticus</i>	4,5 – 5,5	80	n.d	n.d

Fonte: Gékas e López-Leiva (1985); Harju, Kallioinen e Tossavainen (2012). (n.d: não disponível).

A atividade e a estabilidade das enzimas são influenciadas por diversos fatores ambientais, como: temperatura, pH, meio de reação (concentração de enzima e substrato), concentração e tipo de inibidores e/ou ativadores, agitação, força iônica, atividade de água, os quais podem afetar fortemente a estrutura tridimensional específica ou conformação espacial da macromolécula (JURADO *et al.*, 2002; MACEDO *et al.*, 2005).

Entre os fatores ambientais, o pH exerce efeito importante, uma vez que, todas as enzimas são sensíveis às variações da concentração de íons H^+ do meio (RICHARD, 1985). Podemos definir o efeito do pH na atividade enzimática, como o efeito nos grupos ionizáveis envolvidos no sítio ativo da enzima. Estes grupos podem fazer parte da conformação própria do sítio ativo, na ligação do substrato à enzima ou na transformação do substrato em produto. A maioria das proteínas é ativa apenas em um intervalo de pH, normalmente entre 5 a 9 (VOET, VOET, PRATT, 2002; MACEDO *et al.*, 2005).

Existe uma faixa de pH ótimo, onde a atividade do biocatalisador é máxima. Essa faixa é dependente de vários parâmetros como temperatura, força iônica, concentração em substrato, parâmetros externos e da natureza da enzima (RICHARD, 1985; KIELING; FÚRIGO-JÚNIOR, 2002). A determinação desta faixa de pH é útil para a manutenção da forma ativa da enzima durante uma reação, ou para a inativação da mesma quando necessário. Muitas enzimas se desnaturam irreversivelmente em soluções muito ácidas ou muito alcalinas (MACEDO *et al.*, 2005).

Em geral, lactases obtidas de fungos possuem pH ótimo de atuação numa faixa ácida (2,5 - 4,5) enquanto o pH ótimo de atuação de lactases provenientes de leveduras (6,0 - 7,0) e bactérias (6,5 - 7,5) está numa região mais neutra. Neste caso, possibilita ajustar a lactase mais apropriada para cada aplicação. Por exemplo, lactases fúngicas são mais adequadas para hidrólise de soro ácido e lactases de leveduras / bactérias são mais apropriadas para hidrólise do soro doce e do leite (KLEIN, 2010).

Da mesma forma, a temperatura é um parâmetro extremamente crítico na determinação da estabilidade enzimática. Um aumento da mesma pode resultar no aumento da velocidade de reação, até uma temperatura denominada ótima, na qual ocorre atividade máxima (MACEDO *et al.*, 2005). Neste caso ocorre o aumento da agitação das moléculas, com elevação da temperatura, que aumenta a frequência de colisões entre o substrato e a enzima (RICHARD, 1985).

Por outro lado, um aumento excessivo deste parâmetro resulta na diminuição da atividade devido à desnaturação da enzima, que foi submetida acima da temperatura crítica (MACEDO *et al.*, 2005). Essa desnaturação vai modificar a estrutura terciária e quaternária da proteína, fazendo com que a enzima passe de uma conformação ativa, para uma conformação inativa (RICHARD, 1985).

Tremarin (2007) estudando a hidrólise enzimática de lactose, em reator de membrana, utilizando uma β -galactosidase de *K. lactis*, verificou dentre os valores testados de temperatura (37, 40 e 43°C), que a temperatura de 40°C teve uma influência positiva na hidrólise da lactose. Em temperaturas menores, a hidrólise manteve-se praticamente constante, enquanto a temperaturas superiores a 40°C, a atividade da enzima foi fortemente reduzida, com conseqüente queda na taxa de hidrólise.

2.2 IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS

Uma objeção para o uso de enzimas reside no fato de possuírem um elevado custo, especialmente se purificadas. Neste caso, a imobilização do biocatalisador eliminaria este problema, uma vez que, a princípio, pode ser usado repetidas vezes. A imobilização enzimática pode ser efetuada por meio de diversas metodologias (DALLA-VECCHIA, NASCIMENTO; SOLDI, 2004; SANTOS, 2012).

As pesquisas neste campo de imobilização se intensificaram a partir dos anos 60, com sentido de estabelecer métodos eficientes para ligar enzimas, tanto por meios físicos, quanto químicos, a suportes inertes insolúveis (VITOLLO, 2001). Atualmente novas tecnologias têm sido implementadas para aprimorar a imobilização enzimática, tendo como objetivo o melhoramento do carregamento, atividade e estabilidade e redução do custo do biocatalisador (ANSARI; HUSAIN, 2012).

O processo de imobilização essencialmente é definido como, enzimas fisicamente confinadas ou localizadas em determinada região definida do espaço, com retenção de sua atividade catalítica e que podem ser utilizadas repetida e continuamente (KATCHALSKI-KATZIR; KRAEMER, 2000; GIRELLI; MATTEI, 2005).

A imobilização ocorre através da fixação da enzima em suportes sólidos, obtendo-se um sistema heterogêneo, que imita o modo natural de ocorrência em células vivas, onde as

enzimas, para a maioria dos casos, estão ligadas a membranas celulares. Assim, em comparação com enzimas livres em solução, as imobilizadas são mais robustas e mais resistentes a alterações ambientais. Além disso, este processo permite a fácil recuperação da enzima e do produto, reutilização múltipla, operação contínua, cessação rápida das reações e maior variedade de projetos de biorreatores (KRAJEWSKA, 2004; FAJARDO-OCHOA *et al.*, 2011). Ainda, a separação de produtos se torna fácil e, em muitos casos, traz reduções econômicas e gera menos efluentes, reduzindo assim os impactos ambientais (MILETIC; NASTASOVIC; LOOS, 2012).

Em geral, as técnicas de imobilização visam permitir processos contínuos, reuso da enzima, aumento de estabilidade, resistência a condições extremas de pH, temperatura e força iônica. Em diversos casos, a perda de atividade é compensada pela possibilidade de reuso do biocatalisador (JOCHEMS *et al.*, 2011). Além do que, o interesse na imobilização é obter um biocatalisador com atividade e estabilidade que não sejam afetadas durante o processo, quando comparado a sua forma livre, sendo que a imobilização pode aumentar ou diminuir essa estabilidade (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004).

Ao se agregar uma enzima a um material inerte, por mais suave que seja o procedimento, é natural ocorrer algum efeito sobre a atividade catalítica, pois esta se encontra intimamente ligada ao suporte. Vale salientar, que nos processos de imobilização devem-se empregar métodos brandos e bem controlados, respeitando a estrutura nativa da proteína e as ligações criadas entre suporte e enzima. Os efeitos da imobilização resultam da interação de diferentes fatores, como a modificação da estrutura tridimensional da enzima, sob a ação de injunções devidas à fixação; modificações do microambiente; fenômenos de difusão no interior do complexo e impedimento estérico. Ou seja, podem abranger efeitos estéricos e conformacionais, efeitos do microambiente e difusionais internos e externos. Sendo este conjunto de fatores determinantes na atividade e estabilidade do biocatalisador (BERSET, 1985; VITOLO, 2001).

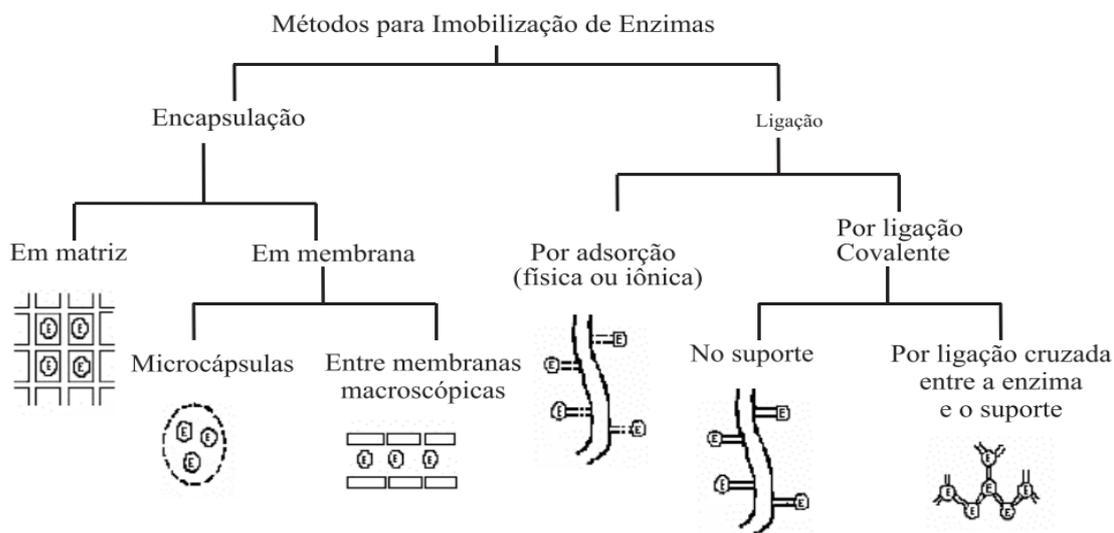
Como mencionado, a enzima com sua mobilidade restringida, pelo fato de estar ligada a um suporte, dificulta a acessibilidade do substrato à mesma, o que leva à aparente redução da atividade, neste caso provocado por restrições difusionais. Além disso, ocorre também acúmulo de produto na proximidade do sítio ativo, o que pode afetar a cinética de reação, pela redução da velocidade de reação ou alteração do pH no microambiente da enzima (PESELA *et al.*, 2007).

As enzimas imobilizadas têm sido empregadas na síntese de compostos bioativos e de novos biopolímeros, metodologias analíticas por meio de construção de biossensores, terapia enzimática e processos em indústrias tradicionais como óleos e gorduras, curtumes, papel e celulose, têxtil e cosméticos, entre outros (MENDES *et al.*, 2011)

Vale destacar que, não há um método de imobilização universal, aplicável para todas as enzimas, apesar da grande diversidade de métodos desenvolvidos e aplicados. Neste caso, para cada aplicação de uma enzima imobilizada é necessário escolher o procedimento mais simples e barato, que resulte em um derivado com boa retenção de atividade e alta estabilidade operacional (MENDES *et al.*, 2011). Dalla-Vecchia, Nascimento e Soldi (2004) afirmam que, a escolha de um processo de imobilização enzimática depende de fatores, tais como, os substratos utilizados, os tipos de reações e as configurações do reator, exigindo um projeto adequado para atender às necessidades da reação. Neste caso, a técnica escolhida deve atender a duas necessidades, a catalítica (produtividade, rendimento, estabilidade e seletividade) e a não catalítica (controle e *down-streaming process*) (CAO, 2005).

De acordo com Dalla-Vecchia, Nascimento e Soldi (2004), a imobilização pode ocorrer através da adsorção ou ligação da enzima em um material insolúvel, pelo uso de um reagente multifuncional através de ligações cruzadas, confinamento em matrizes formadas por géis poliméricos ou encapsulação através de uma membrana polimérica, como demonstrado na Figura 2.

Figura 2 – Métodos para imobilização de enzimas.



Fonte: Dalla-Vecchia, Nascimento e Soldi (2004).

Vários métodos podem ser aplicados para imobilizar ou confinar as enzimas em suportes sólidos, estando baseados em mecanismos físicos e químicos (HAIDER; HUSAIN, 2009). Na imobilização através de ligação, via adsorção física, a enzima fica retida na superfície do suporte que se encontra em meio aquoso, através de interações de *Van der Waals*, hidrofóbicas, pontes de hidrogênio e interações específicas. Tal método promove pouca alteração sobre a estrutura nativa da proteína. Porém, apresenta como desvantagem a fácil dessorção enzimática durante a utilização, pois as interações são geralmente muito fracas para manter a enzima fixada ao suporte sob condições severas de processamento industrial (CARDOSO; MORAES; CASS, 2009; SHELDON; VAN PELT, 2013).

A ligação covalente por sua vez, é mais complexa que a adsorção física e pode afetar a estrutura nativa da proteína, devido à alteração do centro ativo, mas tem a vantagem de evitar o fenômeno de dessorção. Neste método, a enzima é covalentemente ligada num suporte ativado através de aminoácidos, como grupos amina de lisina ou arginina, grupos carboxila do ácido aspártico e ácido glutâmico, entre outros (FREITAS *et al.*, 2011; BUKHARI *et al.*, 2014). Esse processo de imobilização deve ocorrer na presença do substrato ou de um inibidor competitivo, oferecendo proteção aos grupamentos funcionais do sítio ativo na matriz do suporte, geralmente ativados por meio de reagentes químicos como brometo de cianogênio, carbodimida e glutaraldeído (PANESAR; KUMARI; PANESAR, 2010).

No procedimento de encapsulação, ocorre a retenção física da enzima nas cavidades internas de uma matriz sólida porosa, constituída geralmente por polímeros entrecruzados como poliacrilamida, gelatina, alginato e poliuretano, k-carragena e colágeno (PANESAR; KUMARI; PANESAR, 2010; MENDES *et al.*, 2011). Algumas matrizes sólidas com carvão ativado, cerâmica porosa e terra diatomácea também podem ser aplicadas (PANESAR; KUMARI; PANESAR, 2010).

Através desta técnica, a enzima geralmente é misturada aos componentes que formarão o polímero e, quando esse é formado, a enzima fica presa à matriz, livre em solução, mas com movimento restrito por uma rede de gel ou polímero. A porosidade da matriz deve evitar a perda da enzima e, ao mesmo tempo, permitir o livre movimento do substrato e do produto (CARDOSO; MORAES; CASS, 2009). A maior limitação é a impossibilidade de interação entre a enzima imobilizada e substratos de alto peso molecular que são incapazes de permear a matriz (HUSAIN, 2010). Em relação às membranas, as mais comumente usadas na

encapsulação são constituídas de náilon, celulose, polisulfona e poliacrilamida (PANESAR; KUMARI; PANESAR, 2010).

Sassolas, Blum e Leca-Bouvier (2012) citam as principais vantagens e desvantagens dos cinco métodos básicos de imobilização, descritos no Quadro 2.

Quadro 2 – Vantagens e desvantagens dos cinco métodos básicos de imobilização de enzimas.

Método de imobilização	Característica natural	Vantagens	Desvantagens
Adsorção	Ligações fracas	- Facilidade operacional - Perda limitada da atividade	- Dessorção - Adsorção não específica
Ligação covalente	Ligação química entre os grupos funcionais da enzima e do suporte	- Nenhuma barreira de difusão - Estável - Curto tempo de resposta - Alta atividade enzimática	- Matriz não regenerável - Produto tóxico com o acoplamento
Confinamento	Incorporação da enzima dentro de um gel ou um polímero	- A atividade catalítica não é influenciada por interações químicas entre o monômero e a enzima - Vários tipos de enzimas podem ser imobilizadas dentro de um mesmo polímero	- Barreira de difusão - Vazamento de enzima - Altas concentrações de monômero e necessidade de enzima por eletropolimerização
Ligação cruzada	Ligação entre enzima e agente de reticulação	- Simples	- Perda da atividade enzimática
Afinidade	Ligação por afinidade entre um grupo funcional em um suporte	- Imobilização controlada e orientada	- Necessidade da presença de grupos específicos na enzima (Ex., Histidina, Biotina)

Fonte: Sassolas, Blum e Leca-Bouvier (2012).

A escolha do método vai depender da enzima a ser imobilizada e sua finalidade, pois um importante requisito para imobilização, é que a matriz deverá fornecer um ambiente inerte

e biocompatível para a proteína, não interferindo em sua estrutura nativa ou comprometendo a sua atividade biológica (MITCHELL *et al.*, 2002). A escolha da técnica de imobilização deverá considerar as relações entre o suporte/enzima/substrato/solvente, para a manutenção das propriedades catalíticas e da estrutura tridimensional da enzima (DALLA-VECCHIA, NASCIMENTO; SOLDI, 2004).

Existem diferentes técnicas e suportes para a imobilização da enzima lactase relatados na literatura. Pessela *et al.* (2003a) referem que, a imobilização de enzimas em suportes pré-existentes pode ser utilizada não só para melhorar a estabilidade da enzima, mas também para melhorar o desempenho do biocatalisador na reação, alterando os parâmetros cinéticos, inclusive. Panesar, Kumari e Panesar (2010) revisaram este assunto e ressaltam o atual interesse e importância em se encontrar um método adequado para a imobilização de β -galactosidase, extraída previamente ou em células microbianas.

Szczodrak (2000) estudou a imobilização de lactase de *Kluyveromyces fragilis* em vidro poroso silanizado, modificado pela ligação com glutaraldeído. O derivado obtido reteve mais de 90 % de sua atividade inicial e foi utilizado na hidrólise da lactose do permeado de soro a 50°C, pH 6,0. O percentual de conversão de lactose variou de 86 a 90 % no processo contínuo e em batelada.

Albayrak e Yang (2002) estudaram a imobilização de β -galactosidase de *A. oryzae* em suporte de fibras de algodão, ativado com cloreto de *p*-toluenossulfonilo. O pH ótimo da enzima imobilizada foi encontrado em pH 4,5. Cerca de 50 mg de enzima foi imobilizada em cada grama de fibra de algodão, com uma eficiência de acoplamento de proteína de 85 % e um rendimento de 55 %. A enzima imobilizada apresentou uma meia-vida de 50 dias a 50°C, e mais de 1 ano a 40°C, uma melhoria de 25 a 28 vezes em comparação com a da enzima livre. A enzima imobilizada também apresentou o mesmo padrão e nível de formação de GOS da lactose, comparada à livre. Neste caso, os autores relatam que o método de imobilização é simples, barato e escalável para aplicações industriais.

Di Serio *et al.* (2003), estudaram o comportamento cinético da enzima β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* imobilizada em diferentes suportes óxidos: sílica, alumina e silicato de alumina. Observaram uma forte dependência entre a atividade da enzima imobilizada com a natureza química e a estrutura física do suporte. O suporte de sílica apresentou melhor desempenho comparado à alumina, para estruturas porosas similares, em média 14 NLU/g. O silicato de alumina apresentou resultados semelhantes aos obtidos com

sílica. A atividade enzimática decresceu com o aumento do tamanho da partícula. O modelo cinético que mais se ajustou foi de Michaelis-Menten com inibição pelos produtos.

Pessela *et al.* (2003a) estudaram a imobilização de uma lactase termofílica de *Thermus* sp. em suporte Sepabeads. O suporte minimizou a inibição pelos produtos formados, permitindo a hidrólise completa da lactose em produtos lácteos. A enzima solúvel rendeu 85 % de hidrólise da lactose, devido a inibição promovida pela galactose e glicose, enquanto que as preparações imobilizadas, com praticamente o mesmo $V_{m\acute{a}x}$ e K_m , permitiram mais de 99 % de hidrólise da lactose.

Nesta mesma perspectiva, Pessela *et al.* (2003b), estudaram duas resinas iônicas empregadas para a imobilização da lactase termofílica de *Thermus* sp.: Sepabeads revestido com polímeros de polietilenoimina (PEI) ou DEAE-agarose. A imobilização foi rápida em ambos os casos. Porém, a força de adsorção foi maior no caso de PEI-Sepabeads. Os derivados deste suporte permaneceram ativos, quase totalmente a pH 5 e 7, e incubação a 50°C. Condições, as quais, que permitem a hidrólise da lactose no leite, juntamente com o tratamento antimicrobiano normalmente realizado.

Mammarella e Rubiolo (2005) estudaram a imobilização de β – galactosidase de *K. fragilis* através da técnica de inclusão utilizando gel de alginato e carragena. A presença de carragena causou impacto positivo na reação, pois a mesma exibe íons de potássio em sua composição, os quais promoveram o aumento da atividade enzimática (213 $\mu\text{mol}/\text{min.g}$ de lactose).

Gaur *et al.* (2006) compararam três técnicas diferentes para imobilização de β – galactosidase de *A. oryzae*: por adsorção em celite, por ligação covalente em quitosana e por formação de agregados com ligações cruzadas. A enzima apresentou maior rendimento em suporte de quitosana (18,4 %), pH ótimo e temperatura de 4,0 e 50°C, respectivamente. Aos 60°C a enzima imobilizada apresentou 1,6 vezes mais estabilidade que a enzima livre, devido à proteção pela matriz de imobilização. Verificaram que a formação de ligação covalente da enzima em quitosana foi mais apropriada para a síntese de oligossacarídeo, enquanto a adsorção e formação de agregados foram mais adequadas para a hidrólise da lactose, produzindo 78 % de monossacarídeos em 12 h. Foi conseguido 4 ciclos de reação com a enzima imobilizada, com atividade residual acima de 70 %..

Vieira (2009) estudou a imobilização de β – galactosidase de *Kluyveromyces* em suportes orgânicos por diferentes metodologias. O derivado com maior atividade catalítica foi

preparado pela imobilização da enzima em hidrogel de quitosana coagulado com KOH e reticulado com glutaraldeído. A proteína imobilizada neste suporte foi cerca de 247 mg/g de suporte. A imobilização não alterou os valores de pH e temperatura. Após quatro ciclos de hidrólise de lactose a 40°C e pH 7,0 a enzima imobilizada manteve 83 % de sua atividade inicial.

Haider e Husain (2009) comparam a hidrólise da lactose de leite e soro utilizando β – galactosidase encapsulada em alginato de cálcio reticulado com concanavalina A, em reator batelada agitado e reator leito fixo. A partir do estudo da cinética da constante de Michaelis-Menten (K_m) foi encontrado 2,51 mM e 5,18 mM para a enzima livre imobilizada, respectivamente. O $V_{m\acute{a}x}$ para a enzima solúvel e preparação imobilizada foi de $4,8 \times 10^{-4}$ mol/min e $4,2 \times 10^{-4}$ mol/min, respectivamente. Cerca de 86 % e 77 % da lactose presente no soro e no leite, respectivamente, foram hidrolisadas em processo batelada após três horas de reação.

Pan *et al.* (2009), ao prepararem e caracterizarem nanopartículas magnéticas de Fe_3O_4 - quitosana, reticuladas com glutaraldeído, na imobilização de β – galactosidase de *A. oryzae*, verificaram que a enzima imobilizada mostrou maior capacidade de armazenamento, pH e estabilidade térmica do que a sua forma livre. Foram formados GOS, com rendimento de 15,5 % (m/v), com hidrólise de 50 % de lactose.

Klein (2010) estudou a imobilização por adsorção da enzima lactase, a partir de um material híbrido à base de sílica, contendo um grupo catiônico orgânico covalentemente ligado. A eficiência de imobilização foi 74 %. O valor de K_m para a enzima imobilizada (9,17 mM) foi sete vezes maior que para a enzima livre (1,25 mM). O pH (7,0) e temperatura (35°C) ótimos para a atividade enzimática não sofreram alteração após a imobilização. O grau de hidrólise da lactose foi de aproximadamente 90,9 % a 35°C durante um período de 2,5 h, na sua primeira utilização. No final do quarto ciclo, a enzima foi capaz de converter 13 % do substrato.

Guidini *et al.* (2010) estudaram a hidrólise de lactose a partir de β – galactosidase de *A. oryzae* imobilizada em resina de troca iônica, Duolite A568, utilizando ou não glutaraldeído como agente reticulante. Os parâmetros cinéticos indicaram que a enzima imobilizada apresentou maior estabilidade quando comparada à livre. A atividade residual da enzima imobilizada sem reticulação foi de 51 % da atividade inicial após 30 utilizações, enquanto que a enzima que sofreu o processo de reticulação com glutaraldeído, manteve 90 %

da sua atividade inicial, nas mesmas condições, e não houve perda de atividade após 3 meses de estocagem em pH 4,5 a 4°C.

Song *et al.* (2010) estudaram a imobilização da enzima β – galactosidase de *K. lactis*, pré-tratada com lactose, em uma superfície de sílica gel, com glutaraldeído com agente de ligação. Observaram que a enzima pré-tratada apresentou melhor capacidade de reutilização em relação à enzima imobilizada sem pré-tratamento, com 63,9 % da sua atividade original, após 10 ciclos de utilização.

Nichele, Signoretto e Ghedni (2011) avaliaram uma nova formulação farmacêutica para o tratamento da intolerância à lactose, com o principal objetivo de aumentar a estabilidade da enzima lactase, a fim de prolongar a sua atividade com o passar do tempo, melhorando o desempenho como suplemento dietético na digestão de lactose. Utilizaram como suporte de imobilização uma matriz de sílica, através da técnica sol-gel. A atividade da enzima foi avaliada *in vitro* na hidrólise de ONPG, pH 7,4 e 37 °C (condições do intestino humano). Os autores concluíram ser um método de imobilização eficaz, pois a matriz de sílica protege a enzima e preserva a sua bio-funcionalidade e estabilidade também melhorada em comparação à enzima livre.

Ansari e Husain (2011) estudaram a imobilização de β – galactosidase de amêndoa em alginato de cálcio-celulose revestido com Concanavalina A, empregando glutaraldeído como agente reticulante. Verificaram que o derivado obtido reteve 72 % de sua atividade inicial e as condições ótimas de pH (5,5) e temperatura (50°C) não sofreram alterações em relação à enzima livre, sendo que a enzima imobilizada mostrou um alargamento notável nestes perfis. Por outro lado, o derivado obtido sofreu maior inibição aos produtos formados e a taxa de conversão de lactose foi menor em relação à enzima livre.

Husain *et al.* (2011) prepararam um suporte de bioafinidade, estável e não tóxico de concanavalina A em camadas de nano partículas de óxido de zinco para a imobilização de β – galactosidase de *A. oryzae*. Os parâmetros cinéticos demonstraram uma melhoria significativa na estabilidade e a atividade da enzima com relação ao pH, temperatura e a inibição do produto após a sua ligação com as nano partículas, que podem contribuir para a sua melhor aplicação posterior. A enzima imobilizada manteve 74 % da atividade inicial após 1 h de exposição a 60 °C, enquanto que a enzima livre, sob as mesmas condições, exibia 34 % de atividade. A constante de Michaelis-Mentem K_m foi 2,38 e 5,88 mM e $V_{m\acute{a}x}$ foi 0,520 e

0,460 mM / min para a β – galactosidase livre e imobilizada, respectivamente. A enzima imobilizada manteve uma atividade por volta de 86 % após o 6 ° ciclo.

Song *et al.* (2012) estudaram algumas técnicas de funcionalização de superfície para imobilizar β – galactosidase de *K. Lactis* em microrreator, sendo a enzima pré-tratada com lactose antes da imobilização. Quando foram utilizados nanotubos de carbono de paredes múltiplas (NTCM), funcionalizados com um agente de ligação (ligação covalente), para a imobilização de β – galactosidase pré-tratada, o microrreator mostrou o mais alto desempenho. O K_m e $V_{m\acute{a}x}$ foram 2,84 mM e 0,52 mM / min , respectivamente , e a conversão de ONPG atingiu 78,3 % durante a reação de fluxo contínuo a um caudal de 2,5 L/min. Os autores referem que as experiências mostraram o pré-tratamento da enzima com o substrato natural, combinado com NTCM funcionalizados com um agente de ligação, melhorou a atividade da enzima imobilizada notavelmente, sendo o estudo promissor para o desenvolvimento de dispositivos microestruturados eficientes usando biomoléculas.

Lima *et al.* (2013) investigaram a produção de β – galactosidase por diferentes estirpes de *Kluyveromyces*, usando lactose como fonte de carbono. A atividade enzimática máxima de 3,8 U/ml foi alcançada através da utilização de *K. lactis*, estirpe NRRL Y1564, após 28 h de fermentação a 180 rpm e 30°C. Essa estirpe foi imobilizada em quitosana ativada com glutaraldeído, utilizando ONPG como substrato da reação de hidrólise. O pH ótimo para a atividade da enzima livre foi 6,5 enquanto que para imobilizada foi 7,0, ao passo que as temperaturas ótimas foram de 50 e 37°C, respectivamente. Aos 50°C, a enzima imobilizada mostrou uma maior estabilidade térmica, sendo oito vezes mais estável do que a livre. A enzima imobilizada foi reutilizada por 10 ciclos, com mais de 70 % da sua atividade inicial. Manteve 100 % da sua atividade inicial armazenada a 4°C e pH 7,0, durante 93 dias. Nas mesmas condições a enzima livre perdeu 9,4 % da sua atividade inicial.

Braga *et al.* (2014) estudaram a imobilização de β – galactosidase de *K. marxianus* CCT 7082, em suporte de Eupergit® C. Através de um planejamento composto central, verificaram que 1,5 mol/L em tampão de fosfato (pH 7,5) e um tempo de reação de 2 h, produziu o rendimento máximo para a enzima livre (15,6 U/mL). Em seguida utilizou-se Eupergit® C (400 mg) como suporte de imobilização e foi observado um aumento significativo no rendimento, obtido após a imobilização (22,0 U/mL). A eficiência de atuação da enzima foi avaliada utilizando ONPG e lactose, com lactose proporcionando melhores resultados. A reutilização foi avaliada, e mais de 50 % da atividade da enzima inicial foi

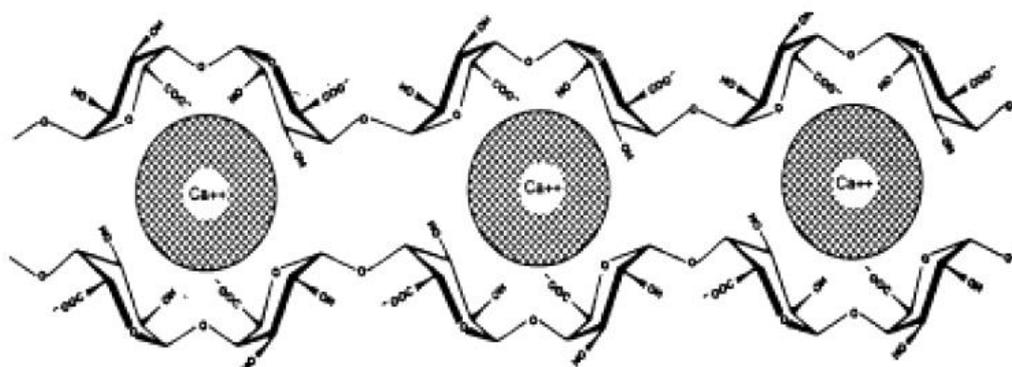
mantida após cinco ciclos de utilização. A imobilização também melhorou alguns aspectos da termoestabilidade de β – galactosidase.

Belhacene *et al.* (2015) realizaram a imobilização de β – galactosidase de *A. oryzae* em partículas magnéticas funcionalizadas com grupamentos amino. Não foram utilizados agentes de ativação, as interações eletrostáticas entre os grupos amino e a enzima permitiu a obtenção de uma forte interação. Os resultados mostraram uma imobilização eficiente de β – galactosidase (58 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de suporte), capazes de hidrolisar substratos, durante dez ciclos de utilização.

2.2.1 Alginato

O alginato é um polissacarídeo obtido de algas marrons, composto dos ácidos β -1-4-D-manurônico e α -1,4-gulurônico (BLANDINO; MACYAS; CANTERO, 2001; BUSTAMANTE-VARGAS *et al.*, 2015). A gelificação do alginato é principalmente alcançada pela troca dos íons sódio por cátions divalentes tais como Ca^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} ou Mn^{2+} . A rede de gel, induzida pela ligação do íon Ca^{2+} , por exemplo, formam junções estáveis (uma rede tridimensional), conforme ilustrado na Figura 3 (ROY; GUPTA, 2004).

Figura 3 – Modelo “Egg-box” da estrutura do gel de alginato com íons de cálcio.



Fonte: Rousseau *et al.* (2004).

No processo, uma solução de alginato de sódio contendo a enzima é misturada a uma solução de íons de cálcio. Ao gotejar a solução que contém o alginato de sódio sobre a solução do íon cálcio ocorre a formação de uma rede polimérica de cálcio e alginato. Uma vez

que, a solução de alginato em contato com um polycation (Ca^{+2}), imediatamente se transforma em gel, devido à ligação entre os blocos ácidos do alginato e íon Ca^{+2} (FREITAS, 2007).

Tanriseven e Dogan (2002) imobilizaram β – galactosidase derivada de *A. oryzae* em um suporte de alginato de sódio e gelatina reticulado com glutaraldeído. A imobilização resultou num rendimento de 56 % e a atividade relativa permaneceu por 35 dias sem redução. As condições ótimas não foram afetadas pela imobilização, o pH ótimo e a temperatura para a enzima livre e imobilizada foram de 4,5 e 50°C, respectivamente.

Shen *et al.* (2011) desenvolveram uma matriz híbrida de alginato-gelatina-fosfato de cálcio para a imobilização de β – galactosidase de *K. lactis*. Verificaram menor atividade relativa (58,6 %) de β – galactosidase imobilizada em esferas de alginato-gelatina-fosfato de cálcio, quando comparada à β – galactosidase imobilizada em esferas da matriz controle (62,3 %), utilizando apenas alginato. Os autores atribuíram este resultado a problemas de transferência de massa ocasionados pela camada de fosfato de cálcio e gelatina formada no suporte.

Freitas *et al.* (2012) desenvolveram um sistema de biocatálise a partir de β – galactosidase de *K. lactis* imobilizada em alginato de sódio, gelatina, e ligação cruzada com glutaraldeído. Constataram que as condições ótimas para a imobilização da enzima foram 6,60 % de alginato (m/v), 4,05 % de gelatina (m/v) e 3,64 % de glutaraldeído (v/v). A enzima imobilizada obtida nas condições otimizadas permaneceu com 80 % da sua atividade inicial após 25 utilizações. Nas concentrações de lactose estudadas (10 a 100 g/L), não houve inibição pelo produto para enzima imobilizada.

2.2.2 Gelatina

A gelatina é uma proteína composta de material hidrocolóide, rica em aminoácidos e pode absorver até 10 vezes o seu peso em água. Tem se mostrado atraente na imobilização de enzimas, devido à sua elevada vida de prateleira (DATTA; CHRISTENA; RAJARAM, 2013). Além de ser economicamente acessível e biocompatível com as enzimas, possui a capacidade de gelificação quando em contato com a água, calor e posterior resfriamento. Por ser solúvel em água, o gel formado tem a característica de ser instável, dissolvendo-se em água com

facilidade, o que faz com que, para o seu uso como agente de imobilização sejam necessárias altas concentrações e, geralmente, agentes de reticulação (KEMPKA, 2012).

A resistência do gel (*Bloom*) é uma medida de dureza, consistência, firmeza e compressibilidade de um gel a uma determinada temperatura, avaliada através da carga em gramas requerida para produzir uma depressão no gel em condições normais. Alto valor de *Bloom* resulta em geis mais firmes. As gelatinas comerciais oscilam entre 50 e 300 g (*Bloom*) (KEMPKA, 2012).

Numanoglu e Sungur (2004) estudaram a imobilização de β – galactosidase de *K. lactis* em suporte de gelatina reticulado com glutaraldeído. As condições ótimas de operação para a enzima imobilizada foram de pH 6,5 e temperatura de 40 °C. A atividade relativa obtida para enzima imobilizada (80 %) manteve-se durante 17 usos e 34 dias.

Bustamante-Vargas *et al.* (2015) pesquisaram a imobilização de um extrato pectinolítico de *A. niger* ATCC 9642, em suporte de gelatina, alginato de sódio e oxalato de cálcio, obtido através do método de mineralização biomimética. A eficiência de imobilização atingiu 72,7 %. Os autores sugerem que, o novo suporte híbrido pode ser uma alternativa potencial para obter pectinases imobilizadas com propriedades vantajosas para aplicações industriais.

2.2.3 Poliuretano

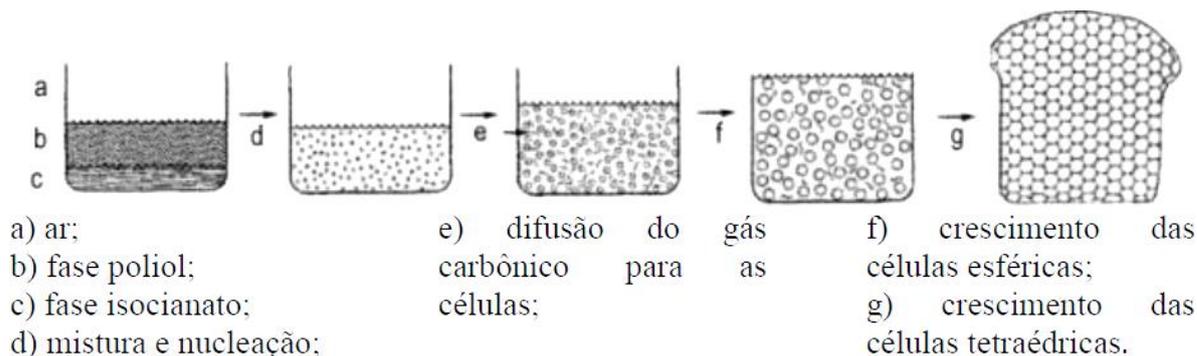
A espuma de poliuretano (PU) é um material inerte, que tem sido utilizado na imobilização de enzimas. Essa espuma é resultante da condensação de policianatos (R-CNO) e polióis (R-OH) (SILVA *et al.*, 2013; SANTIN *et al.*, 2014). Após a polimerização, o dióxido de carbono escapa da matriz, formando poros. As matrizes porosas de poliuretano aumentam as áreas superficiais e também minimizam a limitação por difusão entre substrato e produto (SILVA *et al.*, 2013).

O PU tem recebido atenção, devido a sua versatilidade, apresentando propriedades mecânicas e biológicas muito diferentes, e por ser considerado um dos materiais mais biocompatíveis (SHELKE; NAGARALE; KUMBAR, 2014). Apresenta-se como tecnologia promissora para uso como suporte de imobilização de enzimas em meios orgânicos, possui

propriedades únicas, tais como, a resistência a óleos, solventes e gorduras (GUNCHEVA et al., 2011).

As etapas de polimerização estão apresentadas na Figura 4, onde se visualiza o esquema que representa a nucleação e o crescimento da espuma de PU (VILAR, 2015).

Figura 4 – Esquema representativo das etapas para formação da espuma de PU.



Fonte: Vilar (2015).

Bustamante-Vargas *et al.* (2015a), imobilizaram com sucesso uma pectinase comercial de *A. niger*, em suporte de PU, com rendimento de imobilização de 179 %. Durante a avaliação da estabilidade do derivado imobilizado a 4 °C foi observada uma hiperativação da atividade da enzima, com um aumento de 98% sobre a atividade inicial, após 229 dias. Os parâmetros cinéticos mostraram que o processo de imobilização não alterou a afinidade da enzima pelo substrato. A pectinase imobilizada matenve 35% de atividade por 6 ciclos de utilização.

Fernandes *et al.* (2014) imobilizaram a enzima lipase *Candida antarctica* B (CAL B) em suporte de PU, a fim de verificar a estabilidade de estocagem da enzima livre e imobilizada, em temperaturas de 10 - 25°C e 2 - 8°C. A CAL B livre, em 40 dias, à temperatura de 10 - 25°C, apresentou atividade residual de 52 % e a 2 - 8°C 34 %. Em contrapartida, a imobilizada em PU, em 375 dias apresentou atividades residuais de 87 % e 51 %, respectivamente, nas mesmas condições.

2.2.4 Carvão ativado

Há indícios de que, a primeira referência sobre imobilização de enzimas foi o estudo publicado por Nelson e Griffin no ano de 1916, o qual descreve a conservação da atividade catalítica de invertase adsorvida em carvão ativado e alumina (RICHETTI *et al.*, 2012; RAFAEL, 2014).

O carvão ativado é um material carbonáceo e poroso preparado pela carbonização e ativação de substâncias orgânicas, principalmente de origem vegetal. Apresenta-se como um suporte hidrofóbico, com uma ampla área superficial, alta capacidade de adsorção e sua estrutura contém grupos funcionais. São utilizados extensamente para a adsorção de poluentes em fases gasosas e líquidas, como suporte para catalisadores, na purificação de vários compostos, no tratamento de efluentes, entre outros (SILVA *et al.*, 2005; BRUM *et al.*, 2008).

Sua ativação se dá por dois métodos: pirólise (carbonização) e ativação química. Neste caso, os principais mecanismos de ligação no carvão dependem do tipo de processo de ativação. Assim, quando o carvão é ativado por pirólise, haverá apenas interações hidrofóbicas, enquanto que ao sofrer a ativação química, outros tipos de ligação podem ocorrer (complexação por transferência de carga, ligação de hidrogênio, troca de cátion e outras interações específicas) (SILVA *et al.*, 2005; BRUM *et al.*, 2008).

Este material tem sido bastante utilizado como suporte catalítico, pois apresenta diversas características desejáveis, como alta estabilidade sob condições de reação, propriedades mecânicas adequadas e alta área superficial, mantendo a fase ativa catalítica em um estado bastante disperso (CASTRO *et al.*, 2009). A capacidade de adsorção do carvão ativado depende da natureza do precursor, do tamanho das partículas (grânulos ou pó) e do processo de produção escolhido (BRUM *et al.*, 2008).

Silva *et al.* (2005) estudaram a imobilização da pancreatina, por adsorção, em carvão ativado e em alumina. Testaram diferentes condições (30, 60 e 90 min a 25°C, e 12 h a 5°C) para verificar a taxa de imobilização. Observaram que, ao se utilizar o carvão ativado, não foi observada diferença significativa entre as condições testadas, tendo-se obtido 100 % de imobilização enzimática. Para a alumina, a melhor condição foi a de 90 min, na qual se obteve 37 % de imobilização. A imobilização em carvão ativado e em alumina permitiu a reutilização da pancreatina por até 5 vezes e 2 vezes, respectivamente.

Pintos *et al.* (2013) avaliaram a influência da concentração de carvão ativado sobre a adsorção de β – galactosidase de *A. oryzae* visando à obtenção de derivados imobilizados. Foram testadas as concentrações de 0,5, 1, 5 e 10 %. Na concentração de 1 %, a capacidade de adsorção no equilíbrio foi de 1827 U/g, correspondendo a 51,0 % de adsorção. Desta forma, de acordo com os autores, o carvão ativado tratado, além de possuir baixo custo, é promissor para a imobilização de β – galactosidase, com uma técnica simples e rápida.

Richetti *et al.* (2012) propuseram um delineamento experimental para avaliar o efeito das concentrações de alginato de sódio, glutaraldeído e carvão ativado na imobilização da inulinase de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571. A condição experimental de 20 g/L de alginato de sódio, 50 mL/L de glutaraldeído e 30 g/L de carvão ativado levou à atividade específica mais elevada (2,063.5 U/mg de proteína), um aumento de 26 vezes comparando à atividade da enzima livre. O extrato imobilizado manteve a sua atividade inicial após 43 dias de armazenamento a 40 e 50°C e depois de 138 dias de armazenamento, tanto a 4 quanto a 25°C.

2.2.5 Poli(hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) (PHBV)

O poli(hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) (PHBV) é um polímero biodegradável que vem se destacando nas áreas farmacêutica, alimentícia e médica. Possui uma boa biocompatibilidade, apresentando-se como alternativa para agente encapsulante (MAIA; SANTANA; RÉ, 2004; FRANCESCHI, 2009). Consiste em um poliéster termoplástico biocompatível e biodegradável produzido por bactérias durante a etapa de fermentação em processos biotecnológicos (LEE; CHOI; WONG, 1999; FRANCESCHI, 2009).

A utilização de microcápsulas de PHBV tem atraído atenção, principalmente no campo da biomedicina. Sendil *et al.* (1999) avaliaram a eficiência de encapsulamento da tetraciclina neutralizada e obtiveram entre 51,9 a 65,3 % de encapsulamento do medicamento. Ao mesmo tempo, a biodegradabilidade não foi um parâmetro significativo na liberação de microcápsulas, pois a liberação foi completada antes que qualquer sinal de degradação fosse observado. Kumarasuriyar *et al.* (2005) têm reportado a utilização dos biomateriais poliméricos como potenciais para suportar o crescimento e desenvolvimento de osteoblastos para reparação do tecido ósseo.

No campo da imobilização, Fernandes *et al.* (2014) analisaram nanopartículas de PHBV como suporte para a imobilização da lipase de *Candida antarctica* (fração B). Avaliaram-se os efeitos do tempo de imobilização (30 - 150 min) e pH (5 - 10). Os resultados indicaram um tempo de 120 min e o pH de 7,0 como ótimo para a imobilização. Uma exposição de 21 h do derivado de PHBV – lipase a 60°C mostrou uma redução de 33 % da atividade inicial, enquanto que o armazenamento a 4°C levou a uma atividade de 5 % da atividade original. O derivado foi utilizado sem perda significativa de atividade durante 4 ciclos sucessivos. A utilização da lipase imobilizada como um catalisador na produção de oleato de gerânio gerou 88 % de conversão dos reagentes iniciais para produtos.

2.3 APLICAÇÕES DA ENZIMA β – GALACTOSIDASE

As enzimas em geral exibem características como alto nível de eficiência catalítica, alta seletividade, baixa toxicidade e solubilidade em água; praticamente não apresentam problemas de eliminação, uma vez que, proteínas e peptídeos são biodegradáveis e facilmente removidos. Neste caso, essas moléculas têm uma ampla aplicação nas áreas de química, bioquímica, biomedicina, farmacêutica e industrial (KIRK; BORCHERT; FUGLSANG, 2002; KRAJEWSKA, 2004).

A β – galactosidase é uma importante enzima utilizada em indústrias alimentícias, atua na hidrólise da lactose, sendo considerado um processo promissor no desenvolvimento de produtos sem a presença deste açúcar em suas composições, a enzima pode ser utilizada livre ou imobilizada (PANESAR; KUMARI; PANESAR, 2010).

A enzima é utilizada para produção de cremes visando a não formação de cristais granulosos de lactose; hidrólise da lactose contida no soro, dela resultando açúcares de maior poder edulcorante e maior solubilidade; produção de iogurtes adoçados (menos calóricos); incorporação em medicamentos e aplicação em leite e produtos lácteos, destinados a indivíduos portadores de intolerância à lactose; obtenção de concentrados para sorvetes com baixa quantidade de lactose; produção de xaropes alimentares; tratamento enzimático na produção de queijo, entre outros (EVANGELISTA, 2000; KLEIN, 2010; PANESAR; KUMARI; PANESAR, 2010).

A hidrólise da lactose promove dulçor, permite uma redução na adição de açúcar, resultando em uma menor quantidade de calorias no produto final. Possibilita o consumo de derivados lácteos por pessoas com restrições de dieta relacionadas com a intolerância à lactose e aumenta a qualidade do produto e a eficiência do processo na indústria de laticínios (KLEIN, 2010; HARJU; KALLIOINEN; TOSSAVAINEN, 2012).

Corroborando, Pessela *et al.* (2003a), referem que a utilização da lactose em produtos alimentícios é limitada devido à sua baixa solubilidade, baixo poder adoçante e restrição ao consumo por pessoas que apresentam intolerância a esse sacarídeo. Longo (2006) menciona que, comparando à sacarose, a lactose é cerca de 10 vezes menos solúvel e apresenta um poder edulcorante 6 vezes menor. Ainda, Vieira (2009) refere que, a lactose tem tendência a adsorver odores e sabores e é higroscópica, o que causa o endurecimento dos derivados lácteos em pó.

O emprego da enzima na fabricação de doce de leite, sorvetes e leite condensado, por exemplo, proporciona uma melhora da textura do produto, devido o fato de se evitar a cristalização da lactose (textura arenosa) (KLEIN, 2010). Também proporciona a possibilidade de agregar valor ao soro de queijo, cujo descarte inadequado constitui um grave problema ambiental (PANESAR; KUMARI; PANESAR, 2010; PRAZERES; CARVALHO; RIVAS, 2012).

Em geral, a hidrólise enzimática da lactose, melhora as características tecnológicas e sensoriais de produtos lácteos, aumentando sua digestibilidade, cremosidade, sabor, suavidade, entre outros (KLEIN, 2010; HUSAIN, 2010; PANESAR; KUMARI; PANESAR, 2010).

Ainda pode-se salientar que, em meio à alta concentração de lactose, a enzima realiza a atividade de transgalactosilação da galactose, onde são formados os GOS, estruturas com ligações β -1,4 e β -1,6. Estes compostos apresentam efeitos benéficos para o organismo, tais como redução de metabólitos tóxicos, prevenção do câncer de cólon, aumento da tolerância à lactose e da absorção de cálcio, com consequente redução dos riscos de osteoporose (SANTIAGO; FERNÁNDEZ-MAYORALAS; GARCÍA-JUNCEDA, 2000; MARTINS; BURKERT, 2009; FAI; PASTORE, 2015).

Os GOS são fatores que promovem o crescimento das bactérias intestinais desejáveis, podem ser usados em aplicações potenciais na produção de ingredientes alimentares,

farmacêuticos e de outros compostos biologicamente ativos (SANTIAGO; FERNÁNDEZ-MAYORALAS; GARCÍA-JUNCEDA 2000; FAI; PASTORE, 2015).

Há duas abordagens para a aplicação industrial de β – galactosidases: forma livre, em solução, ou como uma enzima imobilizada em suportes orgânicos e inorgânicos. A abordagem da enzima livre é uma técnica simples, porém limita a reutilização, o que representa uma desvantagem, pois eleva os custos das operações (GÄNZLE; HAASE; JELEN, 2008; HUSAIN, 2010; OLIVEIRA; GUIMARÃES; DOMINGUES, 2011).

Jurado *et al.* (2002) e Vieira (2009) citam vantagens tecnológicas e ambientais de aplicação industrial da lactose hidrolisada por meio da enzima lactase:

- Eliminação da intolerância à lactose (3 a 70 % da população dependendo do grupo populacional) incentivando a utilização da lactose como fonte de energia, tanto quanto a assimilação cálcio e magnésio e demais nutrientes oriundos do leite;

- Formação de galacto-oligossacarídeos durante a hidrólise da lactose, que favorece o crescimento bacteriano da microflora intestinal;

- Melhoria das características tecnológicas e sensoriais dos alimentos contendo lactose hidrolisada a partir do soro ou do leite: aumento da solubilidade (evitando a cristalização da lactose e o granulamento dos sorvetes e produtos condensados ou pulverizados); melhor poder adoçante e ainda redução do conteúdo calórico dos produtos, maior facilidade na produção de iogurtes, diminuição do ponto de congelamento de sorvetes, aumento da maciez e cremosidade;

- Melhor biodegradabilidade do soro no qual a lactose foi hidrolisada, que passará de efluente a subproduto;

- Formação de monossacarídeos que auxiliam no metabolismo do fermento em produtos fermentados, como iogurtes e bebidas lácteas;

- Redução da probabilidade de ocorrência da reação de *Maillard*, pois os galacto-oligossacarídeos obtidos não atuam como açúcares redutores.

A remoção da lactose do leite pode seguir dois caminhos: no primeiro, o leite cru passa pelo processo de esterilização (UHT –141°C/5 s) e depois do resfriamento, adiciona-se a enzima lactase e o leite é colocado em embalagem asséptica. Neste caso, hidrólise da lactose ocorre no interior da embalagem. No segundo, o leite cru passa por uma pasteurização (72°C/15 s) e, após o resfriamento, a enzima lactase é adicionada. Neste processo, a hidrólise se dá dentro de tanques de armazenamento. Assim que termina a hidrólise do açúcar são

realizados a esterilização e o envase asséptico (VITOLLO, 2001; LONGO; WASZCZYNSKYJ, 2006).

Andrade, Brandão e Alvim (2004) utilizaram lactase para hidrolisar a lactose do doce de leite e do creme utilizado para produção de sorvete sem lactose. O doce de leite com lactose hidrolisada apresentou coloração mais escura, sabor mais adocicado e não apresentou cristalização da lactose. O sorvete produzido apresentou textura cremosa, livre do problema de cristalização da lactose e boa aceitação.

Cezar *et al.* (2005) utilizaram lactase para produzir iogurte de morango deslactosado, por meio de fermentação convencional. A enzima foi adicionada em diferentes momentos da fabricação dos iogurtes. O melhor resultado encontrado foi na adição da lactase ao leite por 4 h a 42°C, seguido da adição da cultura láctica e incubação por mais 4 h à mesma temperatura, pois apresentou maior grau de hidrólise e características sensoriais semelhantes ao iogurte produzido sem adição da enzima. Uma vez que, a hidrólise da lactose pode aumentar em até três vezes o dulçor, reduzindo a necessidade de adição de açúcar.

Mariotti *et al.* (2008) avaliaram a hidrólise da lactose do soro de leite por um reator de β – galactosidase de *A. oryzae* imobilizada em sílica. Os melhores resultados de imobilização foram obtidos usando glutaraldeído como ativante do suporte e estabilizador da enzima. A proporção otimizada entre enzima e suporte foi 15-20 mg/g. A atividade de β – galactosidase imobilizada foi de cerca de 650 U/g. Na operação de longo prazo, com a solução de lactose a 40°C, a atividade inicial de 400 U/g foi obtida no reator e a meia-vida do biocatalisador foi estimada em 12 meses. A ultrafiltração foi o melhor tratamento, na busca de uma solução de substrato apropriada para o reator contínuo.

Klein, De Jong e Révillion (2010) avaliaram o efeito da utilização da enzima β – galactosidase sobre a cristalização da lactose no doce de leite. As concentrações testadas da enzima, variaram de 0 a 0,4 g/L. O grau de cristalização do produto foi avaliado sensorialmente após 30, 60, 90 e 180 dias de armazenamento à temperatura ambiente, por provadores previamente treinados. Verificou-se que, a utilização de 0,2 g/L de β – galactosidase (23,16 % de hidrólise da lactose) foi suficiente para que a areosidade no doce de leite não fosse percebida sensorialmente, durante todo o período considerado.

2.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Baseados nos relatos obtidos da literatura percebe-se a importância das técnicas de imobilização, para permitir um melhor aproveitamento das enzimas nos processos industriais. Uma vez que, a enzima imobilizada torna-se mais estável, facilmente recuperável e reutilizável no processo. Na literatura são relatados suportes para imobilização de β -galactosidase, em matrizes orgânicas (quitosana, alginato, gelatina, carragena, entre outros) e inorgânicas (sílica, grafite, fibras de algodão, resinas iônicas, alumina, entre outros).

Nesta perspectiva, o presente trabalho propõe o estudo de suportes para a imobilização da enzima β -galactosidase, em matriz alginato de sódio/gelatina/ CaCl_2 , alginato de sódio e carvão ativado, Poli(hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) e poliuretano, dos quais raras são as informações relatadas para esta enzima. Assim, torna-se de grande importância a realização do presente estudo, pois permitirá proposições de novas metodologias para a imobilização de β -galactosidase, assim como, a definição de características como estabilidade, reuso, pH e temperatura ótima, entre outros parâmetros, que visarão as possíveis aplicações industriais da enzima imobilizada.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Nesta etapa, faz-se uma descrição dos materiais e métodos que foram empregados, bem como os procedimentos laboratoriais realizados durante a fase experimental, para a imobilização da enzima β – galactosidase. Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biotecnologia de Alimentos da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões URI – Erechim.

Tendo como base as metodologias adaptadas, descritas por Shen *et al.* (2011), Silva *et al.* (2013), Richetti *et al.* (2012), Fernandes *et al.* (2014) e Bustamente-Vargas *et al.* (2015a), a estratégia experimental realizada na presente pesquisa foi dividida em duas etapas.

A primeira etapa consistiu na caracterização da enzima β – galactosidase livre, em termos de tempo de reação, pH e temperatura ótimos e os parâmetros cinéticos de K_m e $V_{m\acute{a}x}$.

Nas etapas posteriores, foram efetuadas as metodologias de imobilização em alginato-gelatina–fosfato de cálcio (AGPCa); alginato de sódio e carvão ativado; poli(hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) (PHBV); e poliuretano (PU), bem como a sua caracterização parcial, avaliação do rendimento da imobilização, estabilidade e reuso.

3.1 MATERIAL

Todos os reagentes utilizados durante o desenvolvimento deste estudo foram de grau analítico (P.A) e/ou soluções/tampões preparados. Os principais reagentes/soluções/tampões utilizados nas imobilizações foram:

- Isocianato (Empresa Flexível Poliuretanos);
- Polioliol (Empresa Flexível Poliuretanos);
- Alginato de sódio (Cinética Reagentes-Soluções®);
- Gelatina alimentícia de origem bovina com um *Bloom* \leq 260g (Gelita®);
- Sacarose (Synth®);
- Glutaraldeído 25 % em água (Vetec®);

- Poli(hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) (PHBV) com massa molar (Mw) de 196.000 e índice de poli dispersão de 1,85, purificado (PHB Industrial S/A);

- Solução de cloreto de cálcio 75 mM (Synth®);
- Tris-HCl (Tris hidroximetil-aminometano) (Merck®);
- Fostato de potássio monobásico (Nuclear®);
- Fosfato de potássio dibásico (Cinética®);
- Acetato de potássio (Vetec®);
- Solução de cloreto de manganês 75 mM (Vetec®);
- Solução de cloreto de magnésio 75 mM (Synth®);
- Solução de nitrato de magnésio 75 mM (Vetec®);
- Solução de nitrato de bário 75 mM (Vetec®);
- Solução de nitrato de cálcio 75 mM (Synth®);
- Solução de nitrato de manganês 75 mM (Vetec®);
- Solução de cloreto de bário 75 mM (Vetec®);
- Carvão ativado (Pelegri Carbon®);

Para a etapa de determinação da atividade β – galactosídica, no sobrenadante e no imobilizado, foram utilizados:

- Fosfato de sódio monobásico (Synth®);
- Fosfato de sódio dibásico (Vetec®);
- Acetato de sódio (Synth®);
- Ácido acético glacial (Synth®);
- Carbonato de sódio (Vetec®);
- ONPG - *o*-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo N1127 (Sigma-Aldrich®);

3.1.1 Equipamentos

Os principais equipamentos utilizados neste estudo foram os seguintes:

- Banho ultratermostático (Nova ética®, Unique®, Quimis®);
- Espectrofotômetro (Agilent Technologies 8453®);
- Geladeira (Eletrolux®);
- Liquidificador (Walita®);

- Agitador magnético com potência 650w (Fisatom®);
- Balança analítica (Shimadzu®);
- Bomba a vácuo TE-058 (Tecnal®);
- pH metro DM- 22 (Digimed®);
- Micropipeta (Transferpette®);
- Papel filtro (Whatman®);
- Micro-ondas (Philco®);
- Capela (Quimis®);
- Dispersor T18 basic (Ika®);
- Centrífuga 315R (MPW®);
- Estufa (Odontobrás®);
- Dessecador com sílica (Vidralabor®, Thermex®).
- Freezer (Brastemp®);

3.2 MÉTODOS

Inicialmente foi efetuada a caracterização da enzima quanto ao tempo de reação, pH e temperatura ótimos e parâmetros cinéticos, para posterior, seguir com os experimentos de imobilização. Será apresentada sequencialmente a caracterização da enzima oriunda de *Kluyveromices lactis* e *Aspergillus oryzae*, respectivamente.

3.2.1 Caracterização de β – galactosidase livre

Para o estudo foi utilizada a enzima β – galactosidase proveniente de *K. lactis* (Lactozyme® 2600 L G3665 – Sigma Aldrich®), adquirida na forma líquida e a de *A. oryzae* (Lactase from *Aspergillus oryzae* G5160 – Sigma Aldrich®), adquirida na forma liofilizada.

Inicialmente foi efetuada a caracterização da enzima livre, em termos de tempo de reação, pH e temperatura ótimos, K_m e $V_{m\acute{a}x}$, conforme descrito nos itens a seguir (3.2.1.1, 3.2.1.2, 3.2.1.3).

3.2.1.1 Tempo de reação

O estudo de melhor tempo de reação, com as enzimas previamente diluídas, nos tampões fosfato de sódio e acetato de sódio 100 mM pH 7,0 e pH 5,0, respectivamente, foi realizado nos tempos 1 a 45 min para ambas as enzimas. A medida de atividade se deu conforme item 3.2.7.1 para as β – galactosidases de *K. lactis* (U/mL) e *A. oryzae* (U/mg), onde U equivale às unidades de atividade enzimática ($\mu\text{mol}/\text{min}$).

3.2.1.2 pH e temperatura ótimos

Para estudar o efeito da temperatura e do pH sobre a atividade da enzima, realizou-se um Delineamento Composto Central Rotacional 2^2 (DCCR), totalizando 11 experimentos. As faixas de pH e temperatura foram definidos por ensaios prévios e informações obtidas na literatura (GÉKAS; LÓPEZ-LEIVA, 1985; FREITAS, 2007; KLEIN, 2010; HARJU; KALLIOINEN; TOSSAVAINEN, 2012; RAFAEL, 2014), conforme níveis descritos nas Tabelas 1 e 2, para as β – galactosidases livres oriundas de *K. lactis* e *A. oryzae*, respectivamente. A variável independente tempo de reação foi fixada conforme resultados obtidos no item 4.1.1.

A variável dependente (resposta) foi a atividade de β – galactosidase (item 3.2.7.1) de *K. lactis* (U/mL) e *A. oryzae* (U/mg).

Tabela 1 – Variáveis e níveis utilizados no DCCR (2^2), para a atividade de β – galactosidase livre oriunda de *K. lactis*.

Variáveis independentes	Níveis				
	-1,41	-1	0	+1	+1,41
pH	4,9	5,5	7,0	8,5	9,1
Temperatura	16	20	30	40	44

Tabela 2 – Variáveis e níveis utilizados no DCCR (2^2), para a atividade de β – galactosidase livre oriunda de *A. oryzae*.

Variáveis independentes	Níveis				
	-1,41	-1	0	+1	+1,41
pH	3,6	4,0	5,0	6,0	6,4
Temperatura	36	40	50	60	64

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

Com a finalidade de conhecer e comparar as propriedades cinéticas das β – galactosidasas determinou-se a atividade enzimática, utilizando o ONPG como substrato, em diferentes concentrações molares (0,5 a 12 mM), para ambas as enzimas.

O tempo de reação, temperatura e pH foram fixados, de acordo com os estudos anteriores (itens 3.2.1.1 e 3.2.1.2). Para a determinação dos parâmetros cinéticos, utilizou-se a Equação 1 do modelo de Lineweaver e Burk (1934), descrita abaixo.

$$\frac{1}{V} = \frac{1}{S} \cdot \frac{K_m}{V_{m\acute{a}x}} + \frac{1}{V_{m\acute{a}x}} \quad (1)$$

Onde V é a velocidade inicial, $V_{m\acute{a}x}$ é a velocidade máxima, S é a concentração inicial de substrato e K_m é a constante de Michaelis-Menten.

3.2.2 Imobilização em matriz de alginato/ gelatina/ fosfato de cálcio (AGPCa)

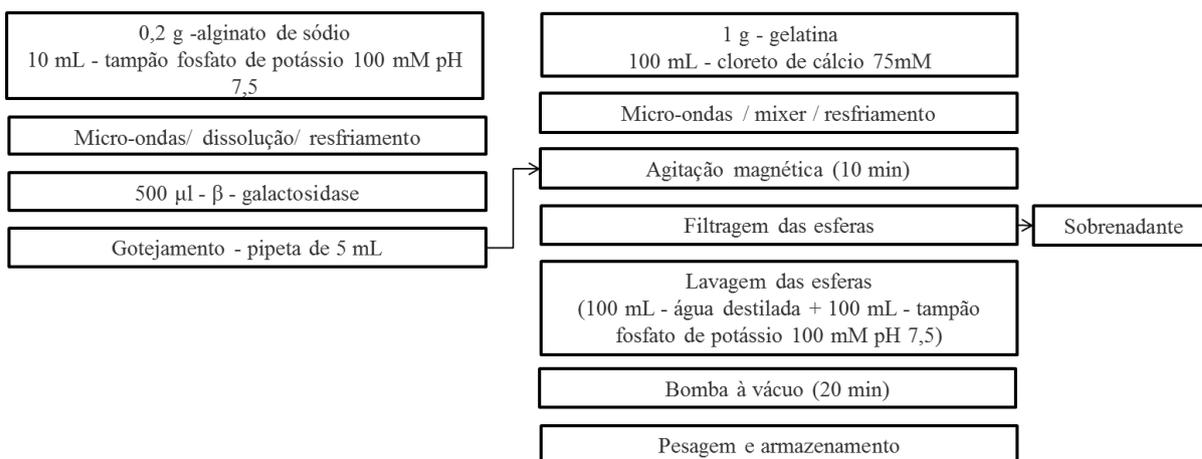
A β – galactosidase comercial de *K. lactis* na forma líquida, foi imobilizada utilizando-se alginato de sódio e gelatina, segundo a metodologia adaptada de Shen *et al.* (2011). As Figuras 5, 6 e 7 apresentam a ilustração dos componentes principais empregados no suporte de imobilização, o fluxograma do processo de imobilização e o esquema de formação das matrizes de encapsulamento, respectivamente.

Figura 5 – Ilustração dos principais materiais do suporte de imobilização: (a) Alginato de sódio; (b) Gelatina.



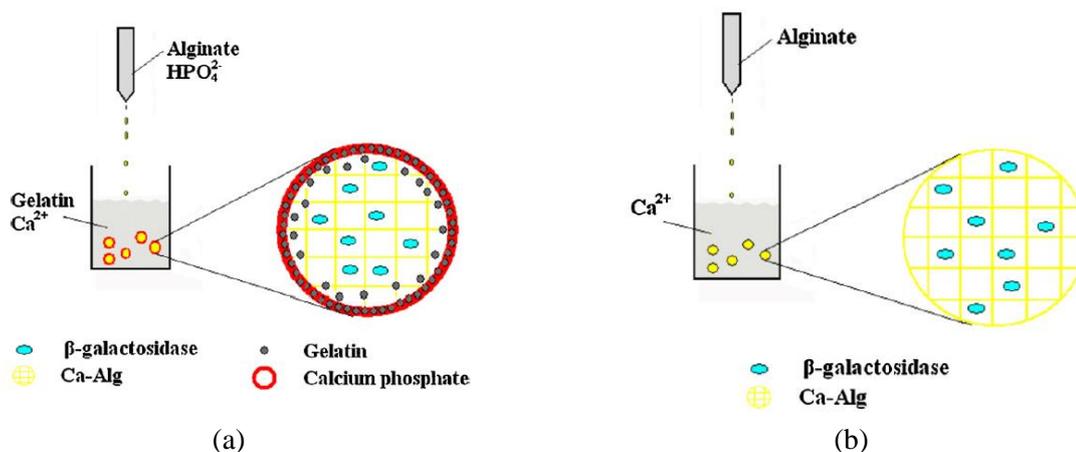
Fonte: O autor (2015).

Figura 6 – Fluxograma do processo de imobilização da enzima β – galactosidase em matriz de AGPCa.



Fonte: O autor (2015).

Figura 7 – Representação esquemática do processo de formação das esferas do suporte de AGPCa (a) e do controle AH₂O (b).



Fonte: Shen *et al.* (2011).

De acordo com a Figura 6, inicialmente o alginato de sódio 2 % (m / v) foi misturado com 10 mL de solução tampão fosfato de potássio 100 mM pH 7,5 aquecido até sua completa dissolução e posteriormente resfriado a temperatura ambiente. A seguir, 0,5 mL da enzima foram adicionados na suspensão de alginato de sódio, baseado em ensaios preliminares (item 4.2.1). O gel de alginato/enzima foi gotejado, com uma pipeta de 5 mL, em uma solução precipitante de cloreto de cálcio (CaCl₂) (75 mM) e gelatina (até uma concentração final de 1 % (m / v)) mantida sob agitação constante com o uso de agitador magnético.

Durante 10 min as esferas permaneceram na solução de CaCl₂ / gelatina para garantir a sua solidificação, posteriormente, foram separadas da solução e lavadas com 100 mL de água destilada e 100 mL de solução tampão fosfato de potássio 100 mM pH 7,5 (BUSTAMANTE-VARGAS *et al.*, 2015). Após o término do processo de lavagem, as esferas foram filtradas com bomba a vácuo, por 20 min. Em seguida, foram armazenadas a 4°C, em solução tampão de acetato de potássio 100 mM pH 6,8 (Shen *et al.*, 2011), e também armazenadas em meio seco, onde, após a secagem, as esferas foram colocadas em tubos vedados, os quais permaneceram imersos em sílica e mantidos a 4°C, de acordo com Bustamante-Vargas *et al.* (2015). Para o experimento controle, seguiu-se o mesmo procedimento descrito anteriormente, com a diferença que a solução precipitante de CaCl₂ (75 mM) não continha gelatina, e durante a formação das matrizes controle se utilizou água destilada para dissolver o alginato de sódio (AH₂O) (Figura 7 (b)).

Foi efetuado um estudo para avaliar o efeito de diferentes tampões no processo de imobilização, deste modo, empregou-se os tampões de fosfato de potássio pH 7,5, fosfato de sódio pH 7,5 e oxalato de sódio pH 7,0.

Ensaio isolados, também foram realizados dissolvendo a enzima em gelatina; em alginato de sódio; em CaCl_2 (75 mM) e na solução tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,5, visando avaliar a influência destes componentes isolados na atividade de β -galactosidase. Os componentes foram diluídos na mesma proporção da enzima livre. O alginato e a gelatina foram dissolvidos primeiramente em água destilada (0,1:10 m/v), para após misturar-se à enzima. Foi efetuada a medida de atividade de β -galactosidase (item 3.2.7.1), o tempo de reação foi 5 min e 20 min a 30°C (item 4.1.1). Nesta etapa, avaliou-se, ainda, o emprego de diferentes sais (solução de 75 mM) para compor suporte de imobilização: nitrato de cálcio ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$), nitrato de bário ($\text{Ba}(\text{NO}_3)_2$), nitrato de magnésio ($\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$), nitrato de manganês ($\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$), cloreto de bário (BaCl_2), cloreto de magnésio (MgCl_2), cloreto de manganês (MnCl_2) e o cloreto de cálcio (CaCl_2). A diluição da enzima nos sais (75 mM) foi na mesma proporção da enzima livre. O resultado foi avaliado qualitativamente pela intensidade da coloração (amarela) após reação com o substrato ONPG (item 3.2.7.1), foi efetuada a medida de pH desta reação. Baseados nos resultados qualitativos preliminares, ensaios de imobilização foram efetuados variando-se a molaridade (75, 100, 250, 500 e 1000 mM) dos sais e avaliando-se o aspecto e a formação de esferas.

3.2.2.1 Tempo de reação para a dosagem de atividade de β -galactosidase imobilizada

O estudo cinético do tempo ótimo de reação foi conduzido com o objetivo de determinar em qual circunstância seriam obtidos os maiores valores de atividade de β -galactosidase. Para isto, utilizou-se 0,2 g de amostra de esferas contendo a enzima imobilizada. O imobilizado foi adicionado o substrato (ONPG) e a reação incubada a 30°C por períodos de reação de 5, 10, 15, 20, 25 e 30 min. A dosagem de atividade de β -galactosidase (U/g) foi realizada (item 3.2.7.1). O estudo do tempo foi efetuado antes (condições normais) e após (condições otimizadas) o planejamento fatorial completo DCCR 2^2 (item 3.2.2.2).

3.2.2.2 Delineamento experimental de imobilização para alginato de sódio e CaCl₂

Para estudar o efeito das quantidades de alginato de sódio e CaCl₂ sobre a atividade de β – galactosidase imobilizada, realizou-se um DCCR 2², totalizando 11 experimentos. O tempo total de reação foi fixado em 20 min (item 3.2.2.1) e as variáveis alginato de sódio e CaCl₂ e seus níveis utilizados estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 – Variáveis e níveis utilizados no DCCR (2²), para a atividade de β – galactosidase imobilizada na matriz de AGPCa.

Variáveis independentes	Níveis				
	-1,41	-1	0	+1	+1,41
CaCl ₂ (mM)	70,9	75	85	95	99,1
Alginato de sódio (g)	0,16	0,20	0,30	0,4	0,44

A variável dependente (resposta) foi a atividade de β – galactosidase de *K. lactis* (U/g), quantificada através da hidrólise do ONPG (item 3.2.7.1).

3.2.3 Imobilização em suporte de alginato de sódio e carvão ativado

A β – galactosidase comercial de *K. lactis* na forma líquida, foi imobilizada utilizando-se alginato de sódio e carvão ativado, segundo a metodologia de Richetti *et al.* (2012), com modificações.

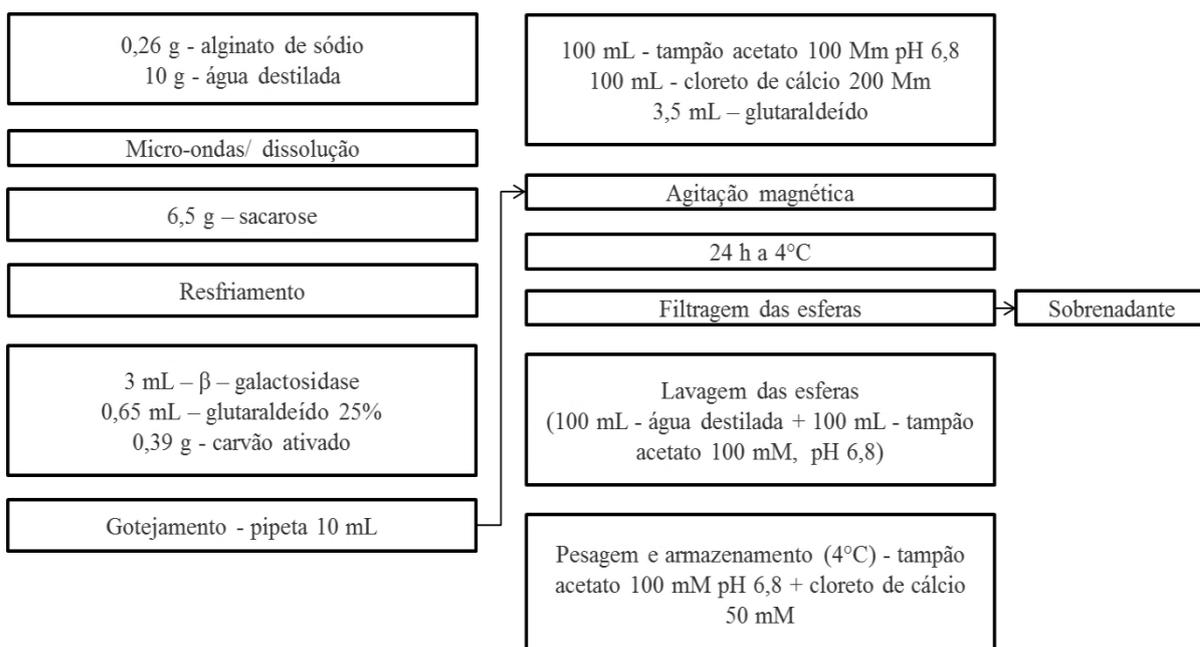
As Figuras 5 e 8 apresentam a ilustração dos principais componentes deste suporte de imobilização, e a Figura 9 exibe o fluxograma de imobilização em alginato de sódio e carvão ativado, respectivamente.

Figura 8 – Ilustração do material do suporte de imobilização: carvão ativado.



Fonte: O autor (2015).

Figura 9 – Fluxograma do processo de imobilização da enzima β – galactosidase em matriz de alginato de sódio e carvão ativado.



Fonte: O autor (2015).

Inicialmente foi preparada uma solução de gel, contendo água destilada (10 g) e alginato de sódio (0,26 g), os quais foram aquecidos em micro-ondas (5 em 5 s), até total dissolução (Figura 9). Em seguida, foi adicionada a sacarose (6,5 g). Após resfriamento à temperatura ambiente foram adicionados a β – galactosidase (3 mL), o glutaraldeído 25 % (0,65 mL) e o carvão ativado (0,39 g). Com uma pipeta de 10 mL o gel foi gotejado em uma

solução contendo: 100 mL de solução tampão acetato 100 mM pH 6,8 e cloreto de cálcio 200 mM, com 3,5 % de glutaraldeído (3,5 mL), sob agitação magnética.

Após a imobilização, as esferas permaneceram nesta mesma solução, armazenada a 4°C, por aproximadamente 24 h. Em seguida, as esferas foram lavadas com água destilada (100 mL) e solução tampão acetato pH 6,8 100 mM (100 mL). Posteriormente, as esferas foram imersas em uma solução tampão acetato 100 mM, pH 6,8 e cloreto de cálcio 50 mM, e novamente armazenadas a 4°C.

3.2.4 Imobilização em suporte de poli(hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) (PHBV)

A β – galactosidase comercial de *K. lactis* na forma líquida, foi imobilizada utilizando-se o PHBV, segundo a metodologia de Fernandes *et al.* (2014).

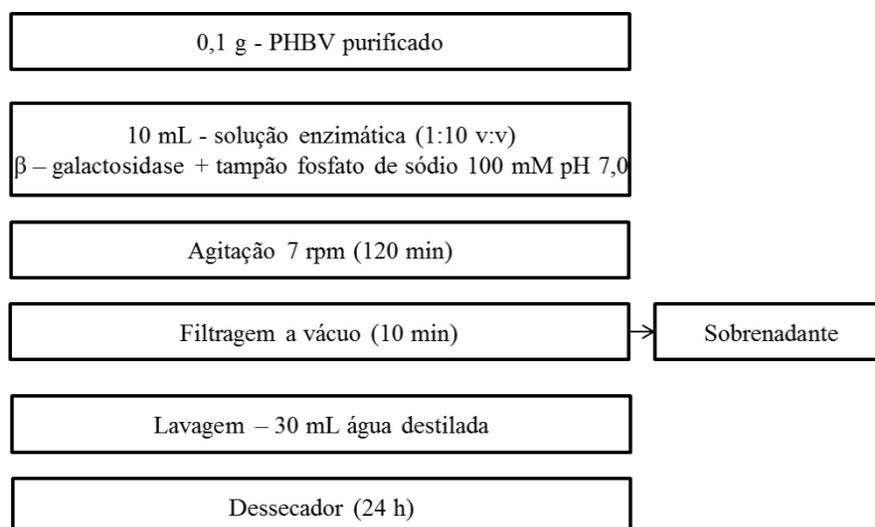
As Figuras 10 e 11 apresentam a ilustração do componente principal empregado no suporte de imobilização e o fluxograma do processo de imobilização de β – galactosidase comercial de *K. lactis* em PHBV, respectivamente.

Figura 10 – Ilustração do principal material do suporte de imobilização: PHBV purificado.



Fonte: Fernandes (2013).

Figura 11 – Fluxograma do processo de imobilização da enzima β – galactosidase em matriz de PHBV.



Fonte: O autor (2015).

O processo de imobilização de β – galactosidase utilizando o suporte PHBV purificado seguiu metodologia descrita por Fernandes *et al.* (2014) e ocorreu em tubos de centrífuga de 50 mL, onde foram adicionados 0,1 g de nanopartículas do PHBV purificado e 10 mL da solução enzimática de β – galactosidase (proporções de 1 mL de enzima:10 mL de solução tampão fosfato de sódio 100 mM pH 7,0 e 1 mL de enzima: 10 mL H₂O destilada (v/v)). Os tubos foram mantidos em temperatura ambiente, sob agitação de 7 rpm por 120 min.

Posteriormente, separou-se o suporte PHBV já com a enzima impregnada, da solução enzimática (sobrenadante), por filtração a vácuo (5 min), realizando-se lavagem com água destilada sob filtro do aparato conectado à bomba a vácuo. Após, a enzima imobilizada foi mantida durante 24 h em dessecador para equalização do teor de umidade. A medida de atividade de β – galactosidase (U/g) seguiu o procedimento descrito no item 3.2.7.1.

3.2.5 Imobilização em suporte de poliuretano (PU)

As Figuras 12 e 13 apresentam a ilustração dos componentes principais empregados no suporte de imobilização e o fluxograma do processo de imobilização de β – galactosidase oriunda de *K. lactis* e *A. oryzae*, respectivamente.

Figura 12 – Apresentação dos monômeros usados na elaboração da espuma de PU, (a) polioliol e (b) isocianato.



(a)

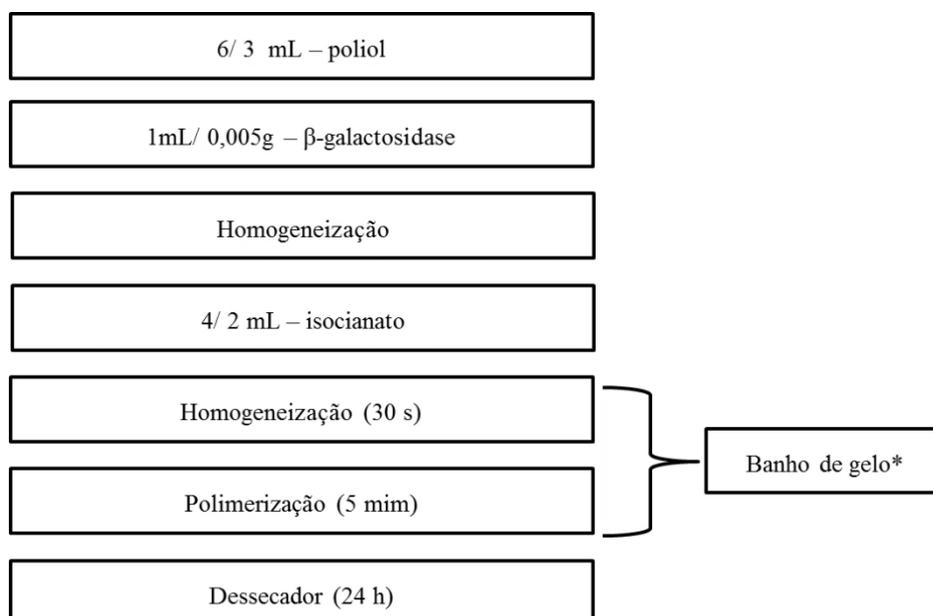


(b)

Fonte: Fernandes (2013).

As β – galactosidases comerciais de *K. lactis* e *A. oryzae* foram imobilizadas em suporte de PU, segundo a metodologias de Silva *et al.* (2013), Fernandes *et al.* (2014a) e Bustamente-Vargas *et al.* (2015a), com algumas adaptações. A reação de polimerização do poliuretano foi realizada na razão molar dos monômeros polioliol (60 e 30 %) e isocianato (40 e 20 %) (v/v) (FERNANDES *et al.*, 2014a; BUSTAMENTE-VARGAS *et al.*, 2015a), através de uma seringa graduada, pela qual os monômeros foram adicionados e homogeneizados com o auxílio de um bastão de vidro, durante 30 s. Após esta etapa ocorreu o estágio de polimerização (5 min) do poliuretano, expansão da espuma e completa solidificação (SILVA *et al.*, 2013).

Figura 13 – Fluxograma do processo de imobilização da enzima β – galactosidase de *K. lactis*/ *A. oryzae* em matriz de PU.



(*) Banho de gelo para a β – galactosidase de *K. lactis*.

Fonte: O autor (2015).

Ensaio de imobilização foram conduzidos adicionando-se 10 % do volume de β – galactosidase de *K. lactis* e também o mesmo volume na forma diluída, em água destilada e solução tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 7,0, na proporção 1:10 (v / v) e 1:5 (v / v), respectivamente. Para a β – galactosidase de *A. oryzae* realizou-se ensaios com 0,005, 0,01 e 0,02 g de enzima liofilizada.

Em todos os casos, as enzimas foram homogeneizadas inicialmente no monômero polioliol e após, com o isocianato (30 s), sendo o recipiente mantenedor da mistura envolto em banho de gelo para a β – galactosidase de *K. lactis*, buscando evitar o aumento excessivo da temperatura devido à reação exotérmica gerada pela mistura dos monômeros, pois o ótimo de ação desta enzima encontra-se em torno de 30°C (item 4.1.2). Após a etapa de polimerização, o poliuretano contendo as enzimas imobilizadas foi mantido durante 24 h em dessecador para equalização do teor de umidade. A dosagem de atividade das enzimas imobilizadas (U/g) foi realizada conforme item 3.2.7.1.

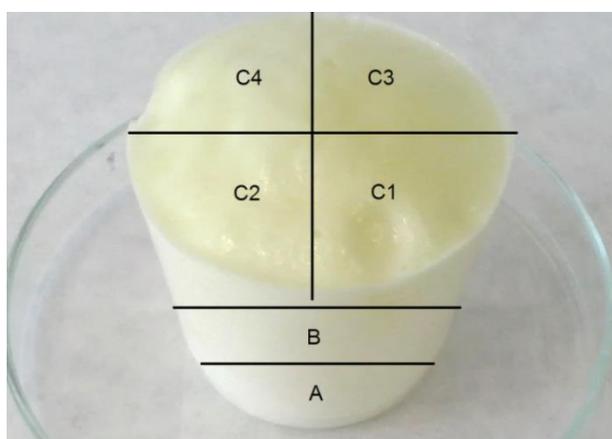
3.2.5.1 Tempo de reação para a dosagem de atividade de β – galactosidase imobilizada

O estudo cinético do tempo ótimo de reação foi conduzido com o objetivo de determinar em qual tempo de reação seriam obtidos os maiores valores de atividade de β – galactosidase imobilizada. Para isto, utilizaram-se 0,05 g da matriz triturada (item 4.3.1), já impregnada com a enzima e incubou-se a 50°C em diferentes períodos de reação: de 1 a 45 min. Após foi efetuada a medida da atividade de β – galactosidase (U/g) (item 3.2.7.1.).

3.2.5.2 Avaliação da distribuição de β – galactosidase na estrutura do suporte de PU

Para verificar a distribuição da enzima de *A. oryzae* no suporte, efetuou-se um estudo da determinação da atividade nas partes da matriz já impregnada com a enzima. Assim, decorrida a polimerização, a estrutura formada, com a enzima inclusa, foi dividida em cortes longitudinais (A, B e C) e transversais (1, 2, 3 e 4), totalizando 12 partes, conforme apresentado na Figura 14. As parcelas foram identificadas, pesadas, trituradas e submetidas à medida de atividade (item 3.2.7.1). Inicialmente determinou-se a atividade das 12 parcelas obtidas e após estas foram reorganizadas, de forma a avaliar a atividade nas frações longitudinais.

Figura 14 – Divisão das partes do suporte já impregnado com a enzima β – galactosidase comercial de *A. oryzae*.



Fonte: O autor (2015).

3.2.5.3 pH e temperatura da enzima imobilizada

Para estudar o efeito da temperatura e do pH sobre a atividade da enzima comercial β -galactosidase de *A. oryzae* imobilizada, realizou-se um DCCR 2², totalizando 11 experimentos. As faixas de pH e temperatura foram definidos baseados no estudo realizado com a enzima livre, conforme níveis descritos na Tabela 2. A variável tempo de reação foi fixada (7 min). A variável dependente (resposta) foi a atividade de β -galactosidase (U/g), conforme metodologia descrita no item 3.2.7.1.

3.2.5.4 Reutilização de β -galactosidase imobilizada em suporte de PU

A matriz impregnada de β -galactosidase de *A. oryzae* foi utilizada sucessivamente em diferentes ciclos de reação a 40 e 50°C. Para ambas as temperaturas, a atividade de β -galactosidase da primeira reação foi considerada como 100 %. Após cada um dos ciclos, o suporte impregnado da enzima foi removido do meio reacional, lavado com água destilada e com solução tampão de acetato de sódio 100 mM, pH 5,0. Após a remoção do excesso destas soluções, com o auxílio da bomba a vácuo (5 min), foi realizada a dosagem de atividade de β -galactosidase (item 3.2.7.1). A Equação 2 fornece o cálculo para a atividade relativa (RA) de cada ciclo.

$$RA (\%) = \frac{\text{Atividade de } \beta\text{-galactosidase no ciclo } n}{\text{Atividade de } \beta\text{-galactosidase no ciclo } 1} \times 100 \quad (2)$$

3.2.5.5 Estabilidade de β -galactosidase imobilizada em suporte de PU

A estabilidade de β -galactosidase de *A. oryzae* imobilizada foi avaliada a 4, 10 e 25°C, sendo que periodicamente foram coletadas amostras para avaliação de atividade residual da enzima, conforme Equação 3 (item 3.2.7.1).

$$EA (\%) = \frac{U_A}{U_I} \times 100 \quad (3)$$

Onde EA é a estabilidade de armazenamento (%), UI é a atividade inicial de β -galactosidase imobilizada (U/g) e UA é a atividade residual da β -galactosidase imobilizada após o armazenamento.

3.2.6 Rendimento da imobilização (RI)

Para determinar o rendimento de β -galactosidase de *K. lactis* e *A. oryzae*, imobilizadas em AGPCa, PHBV e PU avaliou-se as atividades de β -galactosidase livre e imobilizada, sendo que a Equação 4 apresenta o cálculo do rendimento, utilizado em todos os casos.

$$RI (\%) = \frac{U_T}{U_O} \times 100 \quad (4)$$

Onde RI é o rendimento (%), U_T é a atividade total (U) de β -galactosidase imobilizada e U_O atividade de β -galactosidase oferecida para a imobilização.

Para a β -galactosidase de *K. lactis* imobilizada nas matrizes de AGPCa e PHBV avaliou-se, também, o percentual de recuperação, utilizando-se a atividade total de β -galactosidase livre, imobilizada e no sobrenadante (item 3.2.7.1). O cálculo da recuperação foi realizado empregando a Equação 5.

$$R (\%) = \frac{(U_I + U_S)}{U_L} \times 100 \quad (5)$$

Onde R é o percentual de recuperação (%), U_I é a atividade total (U) de β -galactosidase imobilizada, U_L é a atividade total de β -galactosidase livre e U_S é a atividade total de β -galactosidase do sobrenadante.

3.2.7 Determinações analíticas

3.2.7.1 Atividade de β – galactosidase

A atividade da enzima β – galactosidase livre, imobilizada e no sobrenadante, foi determinada através do método colorimétrico de hidrólise do ONPG, conforme proposto por Nagy *et al.* (2001), com algumas adaptações. A reação colorimétrica ocorre a partir da reação de hidrólise do substrato ONPG (líquido incolor), pela β – galactosidase, com formação de *o*-nitrofenol (ONP, coloração amarela) e a leitura realizada em espectrofotômetro a 410 nm (NICHELE; SIGNORETTO; GHEDNI, 2011).

Desta forma, para as enzimas livres e imobilizadas, a solução do substrato ONPG foi preparada a 3 mM, dissolvida em solução tampão fosfato de sódio 100 mM pH 7,0 para a enzima de *K. lactis* e na mesma molaridade, em solução tampão acetato de sódio 100 mM pH 5,0 para a enzima de *A. oryzae*.

A atividade de β – galactosidase livre de *K. lactis* foi testada a 30°C após 5 min e de β – galactosidase de *A. oryzae* foi incubada a 50°C por 20 min, com o substrato ONPG a 3 mM (definido a partir do item 4.1.1). Para as enzimas imobilizadas em AGPCa e alginato de sódio e carvão ativado empregou-se um tempo de reação de 20 min (item 4.2.1.1) e para os suportes de PHBV e PU, o tempo foi de 10 min (FERNANDES *et al.*, 2014) e 7 min (item 4.3.1.1), respectivamente. A mistura de reação foi de 1000 μ L (500 μ L de enzima livre e 500 μ L do ONPG a 3 Mm e/ou 0,005 - 0,2 g de enzima imobilizada com 1500 - 2500 μ L de ONPG a 3 mM), em solução tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 7,0 para a enzima de *K. lactis* e em solução tampão de acetato de sódio 100 mM pH 5,0 para a enzima de *A. oryzae*. As reações foram iniciadas pela adição do substrato e terminadas pela adição de 2000 μ L de carbonato de sódio 100 mM para cessar a reação.

Uma unidade de atividade de β – galactosidase foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 μ mol de ONP/min nas condições do ensaio (U= mol/min) (NAGY *et al.*, 2001). As atividades da enzima livre e no sobrenadante foram expressas em unidades de atividade por mL (*K.lactis*) (U/mL) e por mg (*A. oryzae*) (U/mg), e para a β – galactosidase imobilizada foram expressas em unidades de atividade por g de suporte (U/g). As Equações 6 e 7 apresentam o cálculo para a medida de atividade da enzima β – galactosidase livre e

imobilizada, respectivamente (DE FREITAS, 2013; PERINI, 2013).

$$At = \frac{\Delta A \cdot V_t}{\varepsilon \cdot L \cdot V_e \cdot t} \cdot F \quad (6)$$

Onde At é a atividade da enzima β – galactosidase livre (U/mL - U/mg); ΔA é a diferença de absorvância entre o branco e a amostra; V_t é o volume total da reação; F é o fator de diluição; V_e é o volume da enzima adicionado; t é o tempo de reação; L é o caminho óptico (1 cm); ε é o coeficiente de extinção molar do produto da reação (3,1 cm²/μmol).

$$At_{derivado} = \frac{\Delta A \cdot V_t}{\varepsilon \cdot L \cdot m_{derivado} \cdot t} \cdot F \quad (7)$$

Onde $At_{derivado}$ é a atividade da enzima β – galactosidase imobilizada (U/g); ΔA é a diferença de absorvância entre o branco e a amostra; V_t é o volume total da reação; F é o fator de diluição; $m_{derivado}$ é a massa do suporte imobilizado adicionado; t é o tempo de reação; L é o caminho óptico (1 cm); ε é o coeficiente de extinção molar do produto da reação (3,1 cm²/μmol).

3.2.7.2 pH

O pH foi determinado em potenciômetro digital, após calibração com solução padrão, pH 4,01, 6,86, 9,0 e 10,01.

3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram tratados pela metodologia de planejamento de experimentos e /ou pela análise de variância (ANOVA), seguida de Teste de Tukey/ t -Student com nível de 95 % de confiança, empregando software Statistica® 7.0 (STATSOFT, INC).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo serão apresentados e discutidos os resultados obtidos no decorrer do trabalho, referentes à caracterização de β – galactosidase livre proveniente de *K. lactis* e de *A. oryzae*, envolvendo o tempo de reação, pH e temperatura ótimos e parâmetros cinéticos de K_m e $V_{m\acute{a}x}$. Na sequência serão apresentados os resultados do *screening* de suportes para a imobilização (AGPCa, alginato de sódio e carvão ativado, PHBV e PU) das β – galactosidas de *K. lactis* e *A. oryzae*, bem como, a caracterização parcial, avaliação do rendimento, estabilidade e reuso das enzimas imobilizadas.

4.1 CARACTERIZAÇÃO DE β – GALACTOSIDASES LIVRES

A caracterização das β – galactosidas livres de *K. lactis* e *A. oryzae* foi realizada quanto o tempo de reação, pH e temperatura ótimos e parâmetros cinéticos, com resultados detalhados nos itens 4.1.1, 4.1.2, 4.1.3.

4.1.1 Tempo de reação

A Tabela 4 apresenta os tempos de reação de β – galactosidase livre de *K. lactis* e *A. oryzae*, onde observa-se que os melhores tempos de reação foram 5 min ($0,935 \pm 0,035$), pois a partir do mesmo não houve diferença significativa nas unidades de absorbância; e 20 min ($0,893 \pm 0,007$), pois o aumento do tempo não compensou o ganho de absorbância / atividade enzimática a partir deste ensaio, para as β – galactosidas comerciais livres de *K. lactis* e *A. oryzae*, respectivamente.

Tabela 4 – Estudo do tempo de reação da enzima β – galactosidase comercial livre de *K. lactis* e *A. oryzae*, pelas unidades de absorvância.

Ensaio	Tempo (min)	Unidades de Absorvância*	
		<i>K. lactis</i>	<i>A. oryzae</i>
1	1	0,676 ^c ± 0,125	0,082 ^k ± 0,012
2	2	0,850 ^b ± 0,001	-
3	3	-	0,213 ^j ± 0,005
4	5	0,935 ^{ab} ± 0,035	0,414 ⁱ ± 0,019
5	7	0,952 ^{ab} ± 0,009	0,412 ⁱ ± 0,008
6	10	0,928 ^{ab} ± 0,005	0,566 ^h ± 0,013
7	12	1,042 ^a ± 0,009	0,770 ^g ± 0,010
8	15	1,043 ^a ± 0,001	0,785 ^g ± 0,008
9	17	1,028 ^a ± 0,027	0,838 ^f ± 0,002
10	20	1,022 ^a ± 0,016	0,893 ^e ± 0,007
11	22	1,028 ^a ± 0,017	0,916 ^e ± 0,014
12	25	1,051 ^a ± 0,003	0,963 ^d ± 0,008
13	27	-	0,983 ^{cd} ± 0,010
14	30	1,032 ^a ± 0,007	1,005 ^c ± 0,024
15	35	1,032 ^a ± 0,006	1,059 ^b ± 0,002
16	40	1,021 ^a ± 0,012	1,080 ^{ab} ± 0,001
17	45	1,011 ^a ± 0,001	1,108 ^a ± 0,007

*Média ± DP seguida de letras iguais não diferem estatisticamente em nível de 5 % (Teste *t*-Student).

4.1.2 pH e temperatura ótimos

A Tabela 5 apresenta a matriz do planejamento fatorial completo DCCR 2² (valores reais e codificados das variáveis independentes) e a resposta obtida para atividade de β – galactosidase livre de *K. lactis* e *A. oryzae*.

Tabela 5 – Matriz do planejamento fatorial completo DCCR 2² (valores codificados e reais) e a resposta de atividade de β – galactosidase, para a caracterização parcial das enzimas livres, de *K. lactis* e de *A. oryzae*.

Ensaio	Variáveis independentes*		Atividade de β -galactosidase	Variáveis independentes*		Atividade de β -galactosidase
	X ₁	X ₂	<i>K. lactis</i> (U/mL)	X ₁	X ₂	<i>A. oryzae</i> (U/mg)
1	-1 (5,5)	-1 (20)	0,40	-1 (4,0)	-1 (40)	10,11
2	1 (8,5)	-1 (20)	329,63	1 (6,0)	-1 (40)	8,65
3	-1 (5,5)	1 (40)	0,12	-1 (4,0)	1 (60)	9,35
4	1 (8,5)	1 (40)	79,65	1 (6,0)	1 (60)	12,69
5	-1,41 (4,9)	0 (30)	0,14	-1,41 (3,6)	0 (50)	7,56
6	1,41 (9,1)	0 (30)	5,97	1,41 (6,4)	0 (50)	9,05
7	0 (7,0)	-1,41 (16)	597,13	0 (5,0)	-1,41 (36)	9,75
8	0 (7,0)	1,41 (44)	99,53	0 (5,0)	1,41 (64)	12,71
9	0 (7,0)	0 (30)	566,96	0 (5,0)	0 (50)	14,83
10	0 (7,0)	0 (30)	581,67	0 (5,0)	0 (50)	14,15
11	0 (7,0)	0 (30)	579,15	0 (5,0)	0 (50)	13,87

*X₁= pH e X₂= temperatura (°C). Variável independente fixa: tempo *K. lactis* (5 min), *A. oryzae* (20 min).

De acordo com a Tabela 5, observa-se que a máxima atividade de β – galactosidase livre de *K. lactis* foi de 597,13 U/ mL, a 16 °C e pH 7,0 (ensaio 7) e para a β – galactosidase livre de *A. oryzae*, foi de 14,83 U/mg, a 50°C e pH 5,0 (ensaios do ponto central).

Os resultados da Tabela 5 foram tratados estatisticamente e as Tabelas 6 e 7 (Apêndice A) apresentam o coeficiente de regressão, erro padrão, valores de t e p a um nível de confiança de 95 % das variáveis independentes, demonstrando que o pH e a temperatura exerceram efeito na atividade enzimática de β – galactosidases livres de *K. lactis* e *A. oryzae*.

As Equações 8 e 9 apresentam os modelos codificados de segunda ordem, que descrevem a atividade de β – galactosidases, em função das variáveis independentes, que exerceram efeito significativo (p<0,05), dentro da faixa estudada. Os modelos foram validados pela análise variância – ANOVA, conforme as Tabelas 8 e 9 (Apêndice A), onde os coeficientes de correlação foram de 0,92 e 0,95 e o F calculado foi 2,83 e 7,43 vezes superior ao F tabelado para β – galactosidase livre de *K. lactis* e *A. oryzae*, respectivamente, os quais

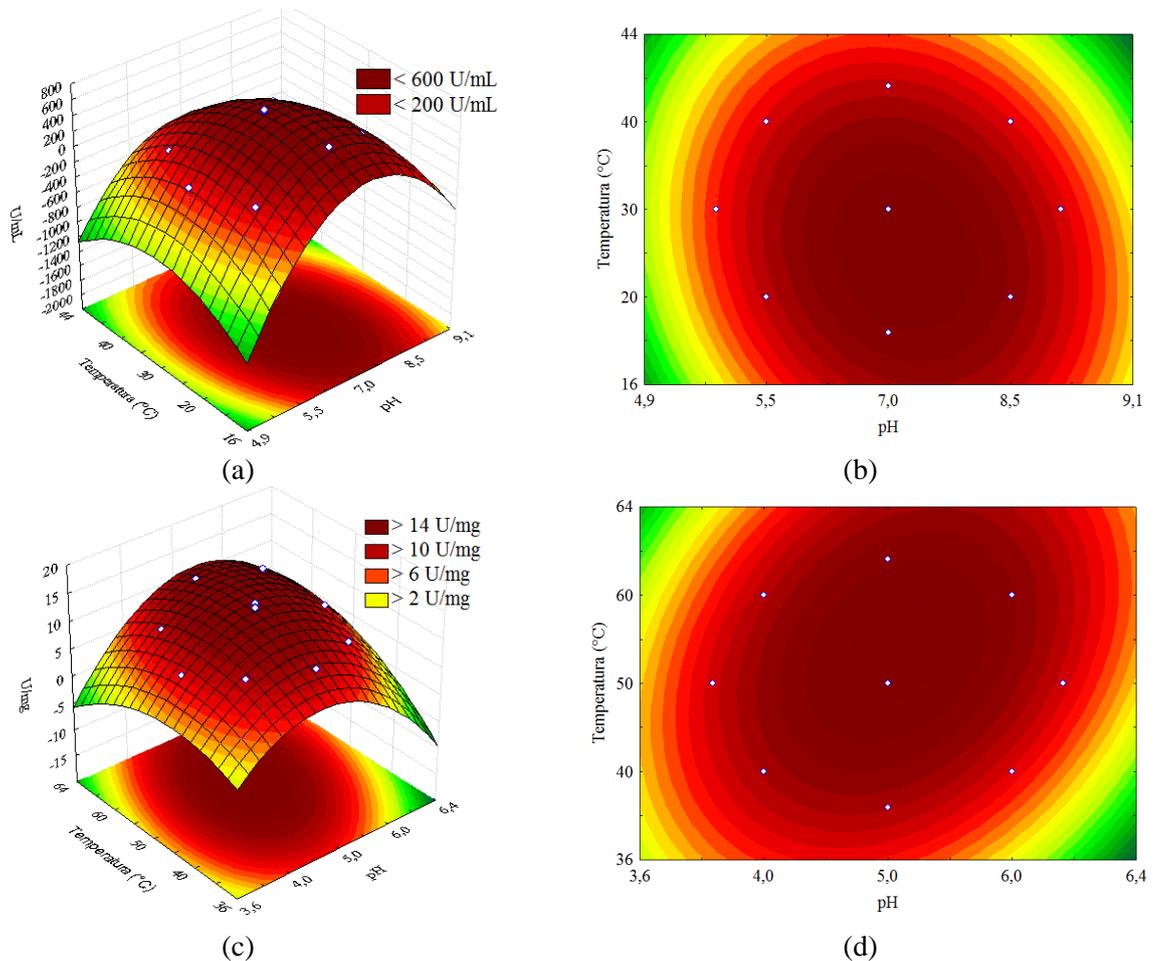
permitiram também a construção das superfícies de resposta e curvas de contorno (Figura 15). Os efeitos que não foram significativos foram adicionados à falta de ajuste para análise de variância (Tabelas 8 e 9 – Apêndice A).

$$B - gal (U/mL) = 576,21 + 52,28 pH - 306,11 pH^2 - 119,34 T - 132,44 T^2 - 62,42 pH.T \quad (8)$$

$$B - gal (U/mg) = 14,28 - 2,89 pH^2 + 0,93 T - 1,42 T^2 + 1,20 pH.T \quad (9)$$

Onde *B - gal* é a atividade de β - galactosidase livre de *K. lactis* (U/mL) e *A. oryzae* (U/mg) e T é a temperatura (°C).

Figura 15 – Superfícies de resposta (a) e (c) e curvas de contorno (b) e (d) para a atividade de β - galactosidase livre de *K. lactis* (U/mL) e *A. oryzae* (U/mg), obtidas em função do pH e a temperatura (°C).



Fonte: O autor (2015).

Na Figura 15, verifica-se que o pH e a temperatura (°C) ótimos estão na faixa próxima ao pH 7,0 e 5,0 e temperaturas próximas a 30 e 50°C para *K. lactis* e *A. oryzae*, respectivamente. Estes valores de pH e temperatura (°C) foram selecionados para os estudos posteriores.

O intervalo de pH ótimo para a enzima fúngica é de 2,5 a 5,4, o que as torna adequadas para o processamento de soro de leite ácido e de seu permeado de ultrafiltração. As temperaturas ótimas para estas enzimas são elevadas, em torno de 50°C (PANESAR; KUMARI; PANESAR, 2010).

As enzimas oriundas de *K. lactis* exibem um pH ótimo próximo ao do leite (6,4 a 6,9) e apresentam atividades consideráveis entre 4 e 6. As temperaturas ótimas para atividade são brandas, na faixa de 35°C (HOLSINGER, 1997; TRONCO, 2003; HARJU, KALLIOINEN E TOSSAVAINEN, 2012).

Husain (2010) refere que as lactases tem potencial para uma faixa pH relativamente amplo: enzimas de fungos entre 2,5 - 5,4, leveduras e enzimas bacterianas entre 6,0 - 7,0. Dependendo da fonte natural, onde a lactose está presente, os valores de pH variam entre aproximadamente 3,5 ou 5,6 de soro ácido a 6,5 no leite.

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

A determinação dos parâmetros cinéticos $V_{m\acute{a}x}$ e K_m foram conduzidas utilizando diferentes concentrações do substrato ONPG, na faixa de 0,5 a 12 mM para ambas as enzimas. Os parâmetros cinéticos foram obtidos pela análise das velocidades iniciais de reação, nas diferentes concentrações de substrato estabelecidas para este estudo, e uma única concentração de enzima. Na Tabela 10 são apresentados os resultados da atividade de β -galactosidases livres de *K. lactis* e *A. oryzae*, obtidos em função das concentrações de substrato [S] ONPG.

Tabela 10 – Atividade de β – galactosidases livres de *K. lactis* (U/mL) e *A. oryzae* (U/mg), em função da concentração do substrato ONPG (mM).

[ONPG] (mM)	Atividade de β – galactosidase*	
	<i>K. lactis</i> (U/mL)	<i>A. oryzae</i> (U/mg)
12	589,16 ^a ± 0,006	19,42 ^a ± 0,185
11	507,87 ^{ab} ± 0,006	19,77 ^a ± 0,146
10	492,39 ^{ab} ± 0,020	19,54 ^a ± 0,418
9	462,97 ^{abc} ± 0,020	19,36 ^a ± 0,061
8	421,93 ^{abcd} ± 0,006	19,41 ^a ± 0,063
7	418,84 ^{abcd} ± 0,039	18,70 ^b ± 0,171
6	356,13 ^{bcd} ± 0,017	18,34 ^b ± 0,204
5	312,77 ^{cdef} ± 0,008	17,65 ^c ± 0,082
4	288,00 ^{def} ± 0,001	17,27 ^c ± 0,018
3	224,52 ^{efg} ± 0,075	16,26 ^d ± 0,213
2	170,32 ^{fg} ± 0,035	13,69 ^e ± 0,102
1,6	150,97 ^g ± 0,030	12,19 ^f ± 0,120
1	85,16 ^h ± 0,008	8,83 ^g ± 0,023
0,5	24,77 ⁱ ± 15,328	5,09 ^h ± 0,035

*Média ± DP seguida de letras iguais/coluna não diferem estatisticamente em nível de 5 % (Teste de Tukey). Tempo *K. lactis* (5 min), *A. oryzae* (20 min). pH e temperatura 7,0 e 30°C e 5,0 e 50°C, para *K. lactis* e *A. oryzae* respectivamente.

De acordo com a Tabela 10 observa-se em ambos os casos, um aumento da atividade da enzima com o incremento do substrato, não apresentando inibição pelo mesmo ($p > 0,05$). O aumento da velocidade com a concentração do substrato sugere que a reação catalisada pela enzima se comportou como uma reação de 1ª ordem. Os perfis de linearização encontram-se nas Figuras 16 e 17 (Apêndice B). As Equações 10 e 11 apresentam os modelos de Lineweaver-Burk para os dados de atividade de β – galactosidase livre de *K. lactis* e de *A. oryzae*, respectivamente. O elevado fator de correlação ($R^2 > 0,99$) indica uma boa adequação dos resultados.

$$\beta - \text{galactosidase (U/mL): } \frac{1}{v} = 0,0091 \frac{1}{s} + 0,0012; R^2 = 0,99 \quad (10)$$

$$\beta - \text{galactosidase (U/mg): } \frac{1}{v} = 0,0752 \frac{1}{s} + 0,0410; R^2 = 0,99 \quad (11)$$

Na Tabela 11 são apresentados os parâmetros cinéticos K_m e $V_{m\acute{a}x}$ para a atividade da enzima β – galactosidase livre de *K. lactis* e *A. oryzae*. Verifica-se que a β – galactosidase livre de *A. oryzae*, apresenta menor valor de K_m (1,83 mM) e $V_{m\acute{a}x}$ (24,39 $\mu\text{mol/min.mL}$), demonstrando maior afinidade pelo substrato ONPG, comparado à enzima de *K. lactis*.

Tabela 11 – Valores de K_m e $V_{m\acute{a}x}$ para a atividade da enzima β – galactosidase livre de *K. lactis* e *A. oryzae*.

β – galactosidase	K_m (mM)	$V_{m\acute{a}x}$ (mM/min.mL)
<i>K. lactis</i>	7,58	0,833
<i>A. oryzae</i>	1,83	0,0244

* $V_{m\acute{a}x}$ (mM/min.mg).

Alguns estudos relatam a avaliação dos parâmetros cinéticos de K_m e $V_{m\acute{a}x}$ para a β – galactosidase livre e imobilizada, que demonstram a afinidade da enzima frente ao substrato. Gaur *et al.* (2006) compararam três técnicas diferentes para imobilização de β – galactosidase de *A. oryzae*, sendo que a enzima apresentou maior rendimento em suporte de quitosana (18,4%). Os parâmetros de K_m e $V_{m\acute{a}x}$, para a enzima livre e imobilizada, respectivamente foram de 2,63 mM e 0,36 $\mu\text{mol ONP/min}$ e 6,38 mM e 0,74 $\mu\text{mol ONP/min}$.

Husain *et al.* (2011) avaliaram os parâmetros cinéticos para a β – galactosidase livre e imobilizada em suporte concanavalina A - óxido de zinco para β – galactosidase de *A. oryzae* e observaram valores de K_m de 2,38 e 5,88 mM e $V_{m\acute{a}x}$ de 0,520 e 0,460 mM/min para a β – galactosidase livre e imobilizada, respectivamente.

Song *et al.* (2012) estudaram o K_m e o $V_{m\acute{a}x}$ para a β – galactosidase de *K. Lactis* pré-tratada em lactose, imobilizada em nanotubos de carbono e empregando como substrato ONPG, obtiveram valores de 2,84 mM e 0,52 mM/min, respectivamente.

Kim, Ji e Oh (2014) caracterizaram uma β -galactosidase recombinante termoestável de *Thermotoga marítima* para a hidrólise de lactose e a produção de GOS. As temperaturas ótimas para a atividade da enzima foram de 85 e 80°C com ONPG e lactose, respectivamente. O valor de pH ótimo foi 6,5 para ONPG e lactose. Os valores de K_m e $V_{m\acute{a}x}$ da enzima termoestável para ONPG a 80°C foram 0,33 mM e 79,6 $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$.

Zhou e Chen (2001) ao estudar a β -galactosidase de *K. lactis*, imobilizada em superfície de grafite, usando glutaraldeído como agente de reticulação, obtiveram para a enzima livre, por Michaelis Menten, os parâmetros cinéticos de K_m e $V_{m\acute{a}x}$, como sendo de 1,74 mM e 77,34 $\mu\text{mol}/\text{ONP}\cdot\text{min}\cdot\text{mg}$, respectivamente.

4.2 IMOBILIZAÇÃO DE β -GALACTOSIDASE DE *K. lactis*

4.2.1 Matriz de alginato/ gelatina/ fosfato de cálcio (AGPCa)

Inicialmente, foram realizados testes preliminares para avaliar a quantidade de β -galactosidase de *K. Lactis* a ser adicionada à matriz AGPCa. A Tabela 12 apresenta a atividade da enzima (U/g), o rendimento de imobilização – RI (%) e a recuperação – R(%) em função da quantidade de enzima utilizada. Verifica-se que, ao usar uma a quantidade de enzima de 500 μL (ensaio 2) obteve-se maior recuperação, embora pouco expressiva. Nos ensaios subsequentes utilizou-se 500 μL de β -galactosidase.

Tabela 12 – Quantidade de β -galactosidase para imobilização em suporte de AGPCa, atividade (U/g), rendimento (%) e recuperação (%).

Ensaio	Quantidade de enzima (μL)	Atividade de β - galactosidase (U/g) *	RI (%)*	R (%)*
1	100	0,08 ^b \pm 0,023	0,66 ^a \pm 0,012	0,06 ^b \pm 0,002
2	500	0,25 ^a \pm 0,025	0,42 ^b \pm 0,005	0,17 ^a \pm 0,017

*Média \pm DP seguida de letras iguais/coluna não diferem estatisticamente em nível de 5 % (Teste *t*-Student); atividade da enzima livre 742 U/mL; tempo de contato 30 min.

A Tabela 13 apresenta os resultados da atividade, rendimento e recuperação de β -galactosidase de *K. lactis* imobilizada em matriz polimérica-inorgânica de alginato, gelatina e

fosfato de cálcio (AGPCa). Verificou-se que houve perda de 99% da atividade inicial de β – galactosidase, tanto no suporte (AGPCa), quanto no controle (AH₂O).

Shen *et al.* (2011), ao imobilizar a β – galactosidase de *K. lactis* em matriz de alginato, gelatina e fosfato de cálcio, referem que a camada inorgânica ocasionou problemas na transferência de massa, porém aumentou significativamente a estabilidade mecânica e reduziu o grau de intumescimento da cápsula formada, melhorou a eficiência de imobilização e inibiu drasticamente a lixiviação da enzima, comparado ao experimento controle. A atividade residual manteve-se acima de 60% após o vigésimo ciclo de utilização, e cerca de 90% depois de 30 dias de armazenamento.

Tabela 13 – Atividade, rendimento e recuperação de β – galactosidase de *K. lactis* imobilizada em suporte de AGPCa e em AH₂O.

Ensaio	Suporte de imobilização	β – galactosidase imobilizada (U/g)*	RI (%)*	R (%)*
1	AGPCa	0,21 ^b ± 0,042	0,34 ^b ± 0,069	0,20 ^b ± 0,034
2	AH ₂ O**	0,45 ^a ± 0,064	0,59 ^a ± 0,081	0,63 ^a ± 0,021

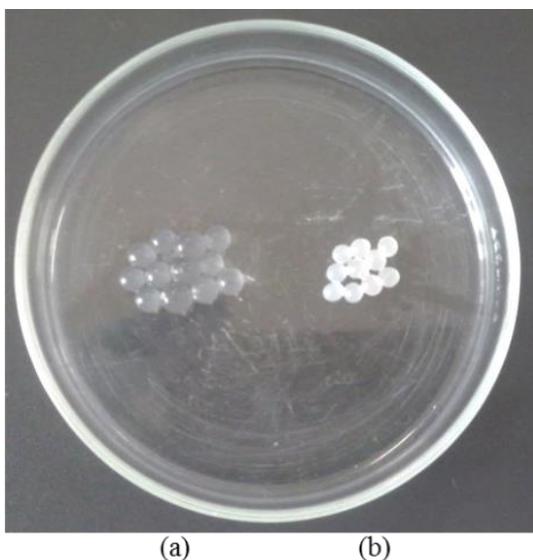
*Média ± DP seguida de letras iguais/coluna não diferem estatisticamente em nível de 5 % (Teste *t*-Student);

**Matriz controle: matriz polimérica-inorgânica de alginato e água (AH₂O). Atividade da enzima livre 742 U/mL; tempo 10 min; quantidade de enzima 500 μ L.

A Figura 18 (a) apresenta o aspecto das esferas da enzima imobilizada e armazenada em solução tampão de acetato de potássio 100 mM pH 6,8 a 4°C. Observou-se um intumescimento e deformação das esferas, o que impossibilitou a sua utilização nas reações. Baseado nestes resultados realizou-se o experimento armazenando as esferas a 4°C, sem o tampão (BUSTAMANTE-VARGAS, 2015). Desta forma, as esferas mantiveram a estrutura regular, sem deformação (Figura 18 (b)), o que permitiu a sua utilização posterior.

Mammarella e Rubiolo (2005) estudaram a imobilização de β – galactosidase de *K. fragilis* através da técnica de inclusão utilizando gel de alginato e carragena. Os mesmos observaram que a enzima encapsulada nos géis foi parcialmente perdida devido ao inchamento do gel.

Figura 18 – Aspecto das esferas de β – galactosidase imobilizada em AGPCa armazenada em solução tampão acetato de potássio 100 mM pH 6,8 (a) e sem o tampão (b), a 4°C.



Fonte: O autor (2015).

4.2.1.1 Tempo de reação para a dosagem de atividade de β – galactosidase imobilizada

Na perspectiva de avaliar a atividade da enzima imobilizada (U/g) em função do tempo de reação com o ONPG, realizaram-se ensaios em diferentes tempos (5 a 30 min) e os resultados são apresentados na Tabela 14.

Tabela 14 – Tempo de reação para a atividade de β – galactosidase de *K. lactis* imobilizada em suporte de AGPCa.

Ensaio	Tempo (min)	Atividade de β – galactosidase (U/g)*	RI (%)*
1	5	0,27 ^a ± 0,052	0,44 ^b ± 0,084
2	10	0,21 ^a ± 0,042	0,34 ^b ± 0,069
3	15	0,20 ^a ± 0,039	0,33 ^b ± 0,063
4	20	0,23 ^a ± 0,041	0,50 ^a ± 0,039
5	25	0,31 ^a ± 0,024	0,37 ^b ± 0,067
6	30	0,25 ^a ± 0,026	0,40 ^b ± 0,041

*Média ± DP seguida de letras iguais/coluna não diferem estatisticamente em nível de 5 % (Teste de Tukey). Atividade da enzima livre 742 U/mL.

O tempo de contato não influenciou ($p > 0,05$) no incremento da atividade enzimática do imobilizado. Embora não tenha sido verificado diferença significativa na atividade em função do tempo, no ensaio 4, com tempo de reação de 20 min obteve-se maior rendimento (0,50 %), desta forma selecionou-se esse parâmetro para estudos os posteriores.

4.2.1.2 Efeitos de diferentes tampões na imobilização

A fim de avaliar os efeitos da solução tampão na imobilização, empregou-se os tampões de fosfato de potássio pH 7,5, de fosfato de sódio pH 7,5 e de oxalato de sódio pH 7,0. Porém, a utilização dos tampões fosfato de sódio pH 7,5 e oxalato de sódio pH 7,0 não possibilitaram a formação de esferas/matriz polimérica e a avaliação da atividade.

Desta forma, empregou-se para os demais experimentos o tampão fosfato de potássio pH 7,5, o qual possibilitou a formação de uma camada superficial de fosfato de cálcio, que interagiu com a gelatina formando a matriz polimérica-inorgânica de encapsulamento para a imobilização de β – galactosidase. Em um estudo semelhante Shen *et al.* (2011) utilizaram o tampão fosfato de potássio (100 mM, pH 7,5), o qual ao entrar em contato com a solução de CaCl_2 (75 mM) e gelatina, conduzia a formação do fosfato de cálcio.

4.2.1.3 Delineamento experimental de imobilização para alginato de sódio e CaCl_2

A Tabela 15 apresenta a matriz do planejamento fatorial completo DCCR 2² (valores reais e codificados das variáveis independentes) e a resposta obtida para atividade de β – galactosidase imobilizada de *K. lactis*, com variação nas concentrações de alginato de sódio e CaCl_2 .

Tabela 15 – Matriz do planejamento fatorial completo DCCR 2² (valores codificados e reais) e a resposta de atividade de β – galactosidase imobilizada de *K. lactis* (U/g).

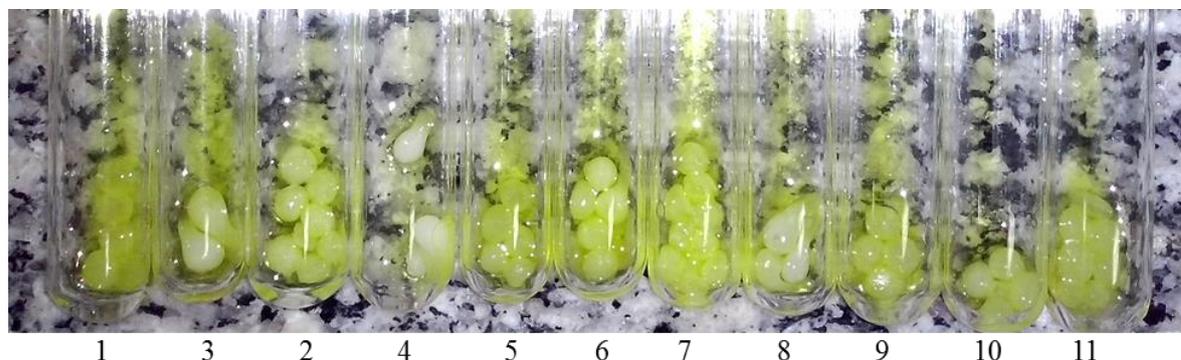
Ensaio ^{**}	Variáveis independentes [*]		β -galactosidase imobilizada (U/g)
	CaCl ₂ (mM)	Alginato de sódio (g)	
1	-1 (75)	-1 (0,2)	0,38
2	1 (95)	-1 (0,2)	0,26
3	-1 (75)	1 (0,4)	0,16
4	1 (95)	1 (0,4)	0,03
5	-1,41 (70,9)	0 (0,3)	0,14
6	1,41 (99,1)	0 (0,3)	0,25
7	0 (85)	-1,41 (0,16)	0,48
8	0 (85)	1,41 (44)	0,06
9	0 (85)	0 (0,3)	0,45
10	0 (85)	0 (0,3)	0,41
11	0 (85)	0 (0,3)	0,43

* Variável independente fixa: tempo (20 min). Atividade da enzima livre 510 U/mL. ** Figura 19.

De acordo com a Tabela 15, observa-se que a máxima atividade de β – galactosidase imobilizada de *K. lactis* foi de 0,48 U/g, empregando 0,16 g de alginato de sódio e 85 mM de CaCl₂ (ensaio 7). Porém, o aspecto das esferas/matriz de imobilização (Figura 19) apresentava uma intensa degradação, possivelmente devido à reduzida concentração de alginato de sódio que formava a matriz de imobilização (0,16 g). Através da Figura 19 foi possível observar que nos ensaios com quantidades reduzidas de alginato de sódio e CaCl₂, as matrizes tendiam a maior degradação durante a determinação da atividade enzimática (ensaios 1, 5, 7).

Os resultados foram tratados estatisticamente e a Tabela 16 (Apêndice A) apresenta o coeficiente de regressão, erro padrão, valores de t e p a um nível de confiança de 95 % das variáveis independentes, demonstrando que a concentração de alginato de sódio (g) e CaCl₂ (mM) exerceram efeito na atividade enzimática de β – galactosidase imobilizada de *K. lactis*.

Figura 19 – Aspecto das esferas de β – galactosidase imobilizada em AGPCa após a reação de medida de atividade do planejamento fatorial DCCR 2².



Fonte: O autor (2015).

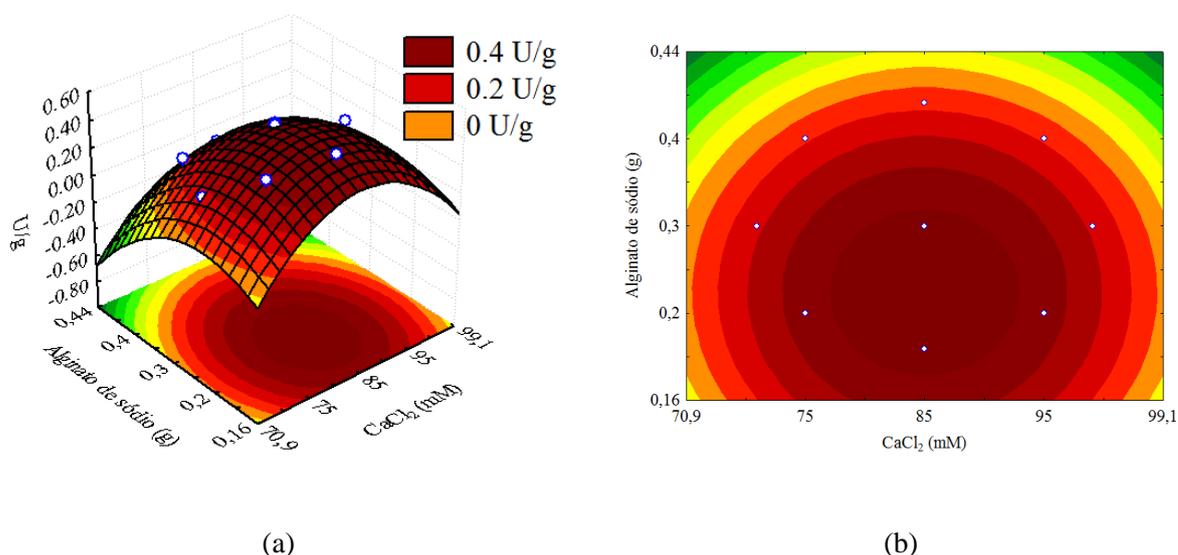
A Equação 12 apresenta o modelo codificado de segunda ordem, que descreve a atividade de β – galactosidase imobilizada, em função das variáveis independentes, que exerceram efeito significativo ($p < 0,05$), dentro da faixa estudada. O modelo foi validado pela análise variância – ANOVA, conforme a Tabela 17 (Apêndice A), onde o coeficiente de correlação foi de 0,90 e o F calculado foi 5,96 vezes superior ao F tabelado para β – galactosidase imobilizada de *K. lactis*, o qual permitiu a construção da superfície de resposta e curva de contorno (Figura 20). Os efeitos que não foram significativos foram adicionados à falta de ajuste para análise de variância (Tabela 17 – Apêndice A).

$$B - gal (U/g) = 0,43 - 0,13 CaCl_2^2 - 0,13 Alg - 0,09 Alg^2 \quad (12)$$

Onde *B – gal* é a atividade de β – galactosidase imobilizada de *K. lactis* (U/g) e Alg é alginato de sódio.

Na Figura 20, verifica-se que, a máxima atividade da enzima imobilizada (0,40 U/g) encontra-se em uma faixa próxima de concentração de 0,2 g alginato de sódio e 85 mM $CaCl_2$. Para estudos posteriores, portanto, foram utilizadas essas concentrações na matriz de imobilização.

Figura 20 – Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para atividade de β – galactosidase imobilizada de *K. lactis* (U/g), obtida em função da concentração de alginato de sódio e CaCl_2 .



Fonte: O autor (2015).

4.2.1.4 Tempo de reação para a dosagem de atividade de β – galactosidase imobilizada em AGPCa sob condições otimizadas

Nesta etapa, avaliou-se o tempo de reação (5 a 35 min) na medida de atividade da enzima imobilizada (U/g) no suporte de gelatina (0,2 g alginato de sódio e 85 mM CaCl_2 , definido no item 4.2.1.3), com o ONPG, sendo que os resultados são apresentados na Tabela 18.

De acordo com a Tabela 18, verifica-se que o tempo de reação, mesmo após a otimização da concentração de alginato de sódio e CaCl_2 , também não influenciou no incremento da atividade enzimática e no rendimento de imobilização, pois a máxima atividade foi de 0,47 U/g e rendimento de 1,39 % (ensaio 1). Nesta perspectiva, buscou-se avaliar os componentes do suporte individualmente, para verificar se os mesmos tinham influência na inativação da enzima (item 4.2.1.5).

Tabela 18 – Tempo de reação para a atividade de β – galactosidase de *K. lactis* imobilizada em suporte de AGPCa.

Ensaio	Tempo (min)	β – galactosidase imobilizada (U/g)*	RI (%)*
1	5	0,47 ^a \pm 0,133	1,39 ^a \pm 0,090
2	10	0,41 ^b \pm 0,030	1,22 ^b \pm 0,072
3	15	0,41 ^b \pm 0,014	1,21 ^b \pm 0,023
4	20	0,38 ^b \pm 0,021	1,11 ^b \pm 0,076
5	25	0,33 ^b \pm 0,014	0,97 ^b \pm 0,040
6	30	0,29 ^b \pm 0,006	0,86 ^b \pm 0,060
7	35	0,26 ^b \pm 0,001	0,76 ^b \pm 0,047

*Média \pm DP seguida de letras iguais/coluna não diferem estatisticamente em nível de 5 % (Teste de Tukey). Atividade da enzima livre 479 U/mL.

4.2.1.5 Efeito dos componentes do suporte de imobilização (AGPCa) na atividade da enzima

A Tabela 19 apresenta a atividade da enzima β – galactosidase de *K. lactis*, adicionada aos componentes individuais da matriz de AGPCa (alginato de sódio, gelatina, CaCl₂ e tampão fosfato de potássio 100 mM pH 7,5). Verificou-se que o CaCl₂ foi o componente que influenciou negativamente na atividade enzimática, ou seja, provocou a inativação da mesma em ambos os tempos estudados (5 e 20 min).

Tabela 19 – Atividade de β – galactosidase de *K. lactis* (U/mL) avaliada com alginato de sódio, gelatina, CaCl₂ e tampão fosfato de potássio 100 mM pH 7,5.

Componentes do suporte de imobilização	Atividade de β – galactosidase (U/mL)	
	5 min	20 min
CaCl ₂ (85 mM)	0	0
Alginato de sódio	432,79 ^c \pm 14,033	267,08 ^b \pm 3,850
Gelatina	524,12 ^b \pm 3,157	244,03 ^c \pm 2,819
Tampão fosfato de potássio 100 mM pH 7,5	777,57 ^a \pm 14,489	293,42 ^a \pm 0,246

*Média \pm DP seguida de letras iguais/coluna não diferem estatisticamente em nível de 5 % (Teste *t*-Student).

Nesta perspectiva, realizaram-se experimentos subsequentes utilizando o nitrato de cálcio ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$), nitrato de bário ($\text{Ba}(\text{NO}_3)_2$), nitrato de magnésio ($\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$), nitrato de manganês ($\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$), cloreto de bário (BaCl_2), cloreto de magnésio (MgCl_2) e cloreto de manganês (MnCl_2) e a influência do pH na reação colorimétrica da medida de atividade de β – galactosidase de *K. lactis* (Tabela 20 e Figura 21).

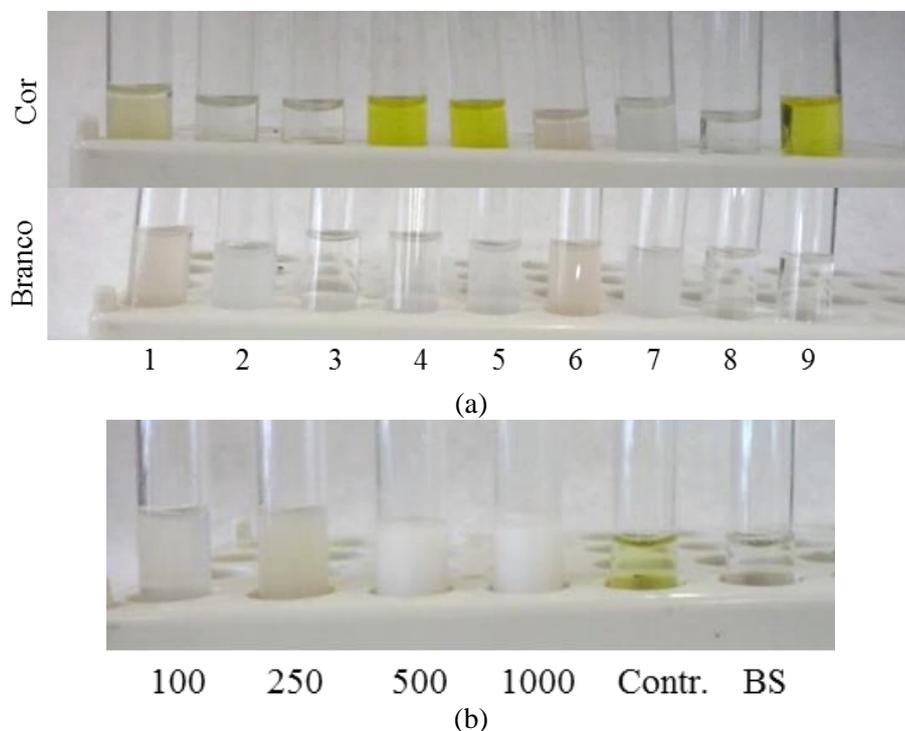
Tabela 20 – Estudo qualitativo da influência dos sais na atividade de β – galactosidase de *K. lactis*.

Ensaio ^{**}	Sais (75 mM)	Intensidade da coloração*	pH
1	Cloreto de manganês	+	6,42
2	Cloreto de cálcio	-	5,71
3	Cloreto de bário	-	6,47
4	Cloreto de magnésio	++	5,98
5	Nitrato de magnésio	++	6,8
6	Nitrato de manganês	-	3,75
7	Nitrato de cálcio	-	7,04
8	Nitrato de bário	-	6,41
9	Controle (U/mL)	++	7,1

*Intensidade da coloração amarela: (-) sem coloração; (+) pouca coloração (++) intensa coloração. ** Visualização da Figura 21 (a).

De acordo com a Tabela 20 e Figura 21 (a) verifica-se que os sais nitrato de magnésio (pH 6,8), cloreto de magnésio (pH 5,98) e cloreto de manganês (6,42) não influenciaram na reação colorimétrica (líquido de coloração amarela), ou seja, ocorreu a formação da cor amarela, a partir da reação de hidrólise do substrato ONPG (líquido incolor) pela β – galactosidase, com formação de *o*-nitrofenol (ONP) de coloração amarela (NICHELE; SIGNORETTO; GHEDNI, 2011).

Figura 21 – Aspecto visual de formação de cor empregando diferentes sais (75 mM) na reação de hidrólise com ONPG (a) e utilizando cloreto de manganês em diferentes molaridades (100 a 1000 mM) (b).



Fonte: O autor (2015). BS – branco do substrato; Contr – Controle - formação de cor pela degradação do ONPG em ONP.

JURADO *et al.* (2002) referem que a atividade das enzimas é fortemente influenciada por fatores ambientais como, temperatura, pH, meio de reação, concentração e tipo de inibidores/ ativadores, agitação entre outros. As β – galactosidases das leveduras *K. fragilis* e *K. lactis*, por exemplo, possuem como condição experimental os cofatores associados: Mn^{2+} , Mg^{2+} , K^+ e Na^+ .

Kim, Ji e Oh (2014) caracterizaram uma β -galactosidase recombinante termoestável de *Thermotoga marítima* para a hidrólise de lactose e a produção de GOS. Verificaram que Mn^{2+} era o cátion mais eficaz para a atividade de β -galactosidase em ONPG e lactose, seguido de Co^{2+} , Fe^{2+} e Mg^{2+} em ordem decrescente. Ca^{2+} e Cu^{2+} evidentemente desativavam a enzima. Na mesma perspectiva, Harju, Kallioinen e Tossavainen (2012) referem que o cálcio e o sódio atuam como inibidores iônicos da atividade de β – galactosidase de *K. lactis*, mesmo sendo espécies iônicas encontradas em produtos lácteos.

Em função dos resultados apresentados na tabela anterior, realizou-se uma nova imobilização (item 3.2.2), empregando o nitrato de magnésio (75 mM), cloreto de magnésio

(75 mM) e cloreto de manganês (75 mM). Porém, apenas o cloreto de manganês possibilitou uma leve formação de esferas/matriz de imobilização. Na sequência, novos ensaios de imobilização foram realizados variando-se a concentração do cloreto de manganês (100, 250, 500 e 1000 mM), visando formar uma estrutura estável da esfera/matriz de imobilização, porém, verificou-se que as concentrações utilizadas de cloreto de manganês influenciaram negativamente na reação de hidrólise e de formação da coloração amarela (Figura 21(b)).

O estudo do suporte de imobilização AGPCa demonstrou não ser adequado para a enzima β – galactosidase de *K. lactis*, pois a enzima apresentou baixa atividade, rendimento e recuperação após a imobilização; o CaCl_2 utilizado para formar a matriz inorgânica e dar suporte à esfera, inativou a enzima; os sais alternativos empregados (nitrato de cálcio, nitrato de bário, nitrato de magnésio, nitrato de manganês, cloreto de bário, cloreto de magnésio e cloreto de manganês) empregados na imobilização não possibilitaram a formação de estruturas esféricas. Neste sentido, novos suportes de imobilização foram testados.

4.2.2 Suporte de alginato de sódio e carvão ativado

A Figura 22 apresenta o aspecto das esferas formadas de alginato de sódio e carvão ativado (a) e a reação de hidrólise da enzima imobilizada em esferas, a partir do ONPG (b).

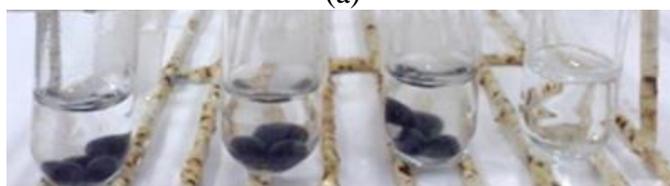
De acordo com a Figura 22 (a) verificou-se que as matrizes formadas apresentaram estrutura rígida e estável, porém o suporte inativou a enzima (Figura 22 (b)), ou seja, não foi possível visualizar a formação de coloração amarela, a partir da hidrólise de ONPG em ONP, após 20 min de reação. Desta forma, não foi efetuada a leitura, nem procedimentos posteriores.

O suporte alginato de sódio e carvão ativado não foi adequado para a imobilização β – galactosidase de *K. lactis*. Em etapas subsequentes, realizaram-se ensaios empregando o suporte de PU na imobilização.

Figura 22 – Ilustração das esferas de alginato de sódio e carvão ativado imobilizadas (a), e reação de hidrólise (b) utilizando a β – galactosidase de *K. lactis*.



(a)



1

2

3

4

(b)

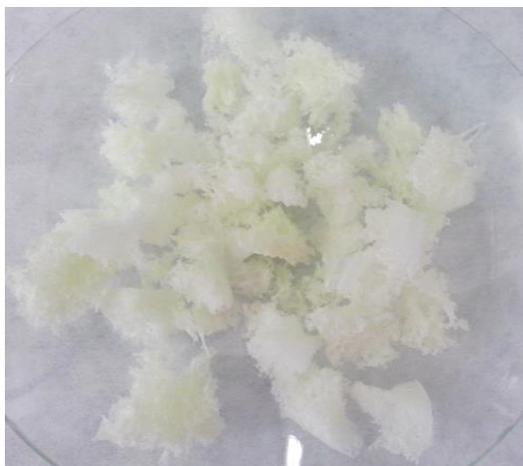
Fonte: O autor (2015). 3 – Branco da enzima; 4 – Branco do substrato.

4.2.3 Imobilização em suporte de poliuretano (PU)

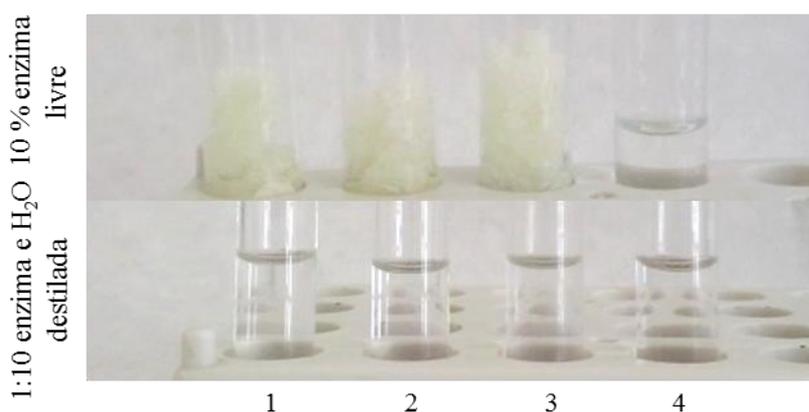
A Figura 23 apresenta o aspecto do suporte de PU de imobilização da enzima β – galactosidase de *K. lactis* (a) e a reação de hidrólise da enzima imobilizada, a partir do ONPG (b).

De acordo com a Figura 23 (a), o suporte de imobilização de PU apresentou aspecto poroso, com espuma flexível e com poros uniformes. Não foi possível observar a formação de cor amarela, oriunda da formação de *o*-nitrofenol (ONP), a partir da reação de hidrólise do substrato ONPG com β – galactosidase em nenhum ensaio controle testado (NICHELE; SIGNORETTO; GHEDNI, 2011) imobilizada em PU, Figura 23 (b).

Figura 23 – Ilustração do suporte de imobilização em PU com a enzima impregnada (a), e reação de hidrólise (b) utilizando a β – galactosidase de *K. lactis*.



(a)



(b)

Fonte: O autor (2015). 3 – Branco da enzima; 4 – Branco do substrato.

O suporte de PU não foi adequado para a imobilização de β – galactosidase de *K. lactis*, pois durante a polimerização ocorreu uma reação exotérmica (NYARY, *et al.*, 2014), fator este, que pode ter afetado a estrutura da proteína, inativando-a. Frente a este resultado, outro suporte para imobilização foi estudado, o Poli(hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) (PHBV).

4.2.4 Imobilização em suporte de poli(hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) (PHBV)

A Figura 24 apresenta o aspecto do suporte de imobilização PHBV impregnado da enzima β – galactosidase de *K. lactis*. A Tabela 21 apresenta a atividade da enzima (U/g), o rendimento de imobilização – RI (%) e a recuperação – R(%) em função da proporção de enzima utilizada em solução tampão fosfato de sódio 100 mM pH 7,0 e em H₂O destilada

Figura 24 – Ilustração do suporte de imobilização de PHBV com a enzima β – galactosidase de *K. lactis* impregnada.



Fonte: O autor (2015).

Tabela 21 – Atividade, rendimento e recuperação de β – galactosidase de *K. lactis* imobilizada em suporte de PHBV.

Ensaio	Solução de diluição	Atividade de β – galactosidase (U/g)*	RI (%)*	R (%)*
1	Tampão**	457,99 ^a \pm 31,67	4,99 ^a \pm 0,345	7,09 ^a \pm 0,345
2	H ₂ O destilada	19,03 ^b \pm 6,20	0,22 ^b \pm 0,071	2,43 ^b \pm 0,071

*Média \pm DP seguida de letras iguais/coluna não diferem estatisticamente em nível de 5 % (Teste *t*-Student).

**Solução tampão fosfato de sódio 100 mM pH 7,0. Atividade da enzima livre 979,8 U/mL.

Através da Tabela 21 observa-se que a enzima apresentou uma atividade de 457,99 U/g quando diluída em tampão tampão fosfato de sódio 100 mM pH 7,0 (ensaio 1). Porém, o rendimento de imobilização foi de aproximadamente 5 %. Isso deve-se ao fato de que a quantidade de suporte gerado por este volume de enzima ter sido de aproximadamente 0,1 g.

Em função dos suportes empregados na imobilização da enzima β – galactosidase de *K. lactis* terem apresentado baixos rendimentos de imobilização e recuperação da enzima no suportes utilizados (AGPCa, alginato de sódio e carvão ativado, PU e PHBV), optou-se por realizar ensaios de imobilização em suporte de PU com a enzima β – galactosidase oriunda de *A. oryzae*. A seguir serão apresentados os resultados deste processo de imobilização.

4.3 IMOBILIZAÇÃO DE β – GALACTOSIDASE DE *A. oryzae*

4.3.1 Imobilização em suporte de poliuretano (PU)

Inicialmente foram realizados testes preliminares para avaliar a quantidade de β – galactosidase de *A. oryzae* a ser adicionada à matriz de PU. A Tabela 22 apresenta a atividade da enzima (U/g) e os rendimentos de imobilização a partir das quantidades estudadas. Verifica-se que, ao utilizar uma a quantidade de 0,005 g de enzima liofilizada (ensaio 1), obteve-se o maior rendimento de imobilização de 11,83%, o qual diferiu ($p < 0,05$) significativamente dos demais ensaios, sendo esta condição definida para os ensaios subsequentes.

Tabela 22 – Quantidade de β -galactosidase de *A. oryzae* utilizada para a imobilização em PU, atividade (U/g) e rendimento de imobilização (%).

Ensaio	Quantidade de β – galactosidase (g)	Atividade de β - galactosidase (U/g)*	RI (%)*
1	0,005	1,78 ^b \pm 0,095	11,83 ^a \pm 0,629
2	0,01	2,32 ^a \pm 0,353	8,32 ^b \pm 1,266
3	0,02	2,67 ^a \pm 0,199	4,74 ^c \pm 0,343

*Média \pm DP seguida de letras iguais/coluna não diferem estatisticamente em nível de 5 % (Teste de Tukey); atividade da enzima livre 15, 40 U/mg; tempo de contato 20 min.

A Tabela 23 apresenta os resultados da atividade de β – galactosidase e do rendimento de imobilização, em função da quantidade de enzima imobilizada e de substrato (ONPG) empregados. Observou-se que ao empregar 0,05 g da enzima imobilizada e 2,5 mL de substrato ONPG 3 mM (ensaio 2), obteve-se maior rendimento de imobilização de 23,21 % e

atividade enzimática de 3,39 U/g. Estes parâmetros (ensaio 2) foram fixados e utilizados para estudos posteriores.

Tabela 23 – Quantidade de suporte imobilizado e substrato (ONPG) adicionados para efetuar a medida de de atividade de β -galactosidase de *A. oryzae* imobilizada em matriz de PU.

Ensaio	Quantidade de β – galactosidase imobilizada (g)	Quantidade de substrato ONPG (mL)	Atividade de β – galactosidase (U/g)*	RI (%)*
1	0,1	3	1,78 ^b \pm 0,095	11,83 ^b \pm 0,629
2	0,05	2,5	3,39 ^a \pm 0,165	23,21 ^a \pm 1,131

*Média \pm DP seguida de letras iguais/coluna não diferem estatisticamente em nível de 5 % (Teste *t* - Student). Atividade da enzima livre 15,40 U/mg; tempo de contato 20 min.

4.3.1.1 Tempo de reação para a dosagem de atividade de β – galactosidase imobilizada

A Tabela 24 apresenta o estudo do tempo de reação para medida de atividade da enzima de β – galactosidase de *A. oryzae* imobilizada em suporte de PU. Verficou-se que o melhor tempo para a medida de atividade, expressando em unidades de absorbância, foi a partir de 7 min (ensaio 4) o qual não difere estatisticamente ($p < 0,05$) dos demais ensaios posteriores. Neste caso específico, a atividade de β – galactosidase foi de 13,86 U/g (ensaio 4), sendo fixado o tempo de 7 min para os demais experimentos.

Tabela 24 – Tempo de reação para a atividade de β – galactosidase de *A. oryzae* imobilizada em matriz de PU, em unidades de absorbância (410 nm) e atividade enzimática (U/g).

Ensaio	Tempo (min)	Unidades de absorbância *	Atividade de β – galactosidase (U/g) *
1	1	0,5428 ^d \pm 0,045	25,17 ^a \pm 1,166
2	3	0,9396 ^c \pm 0,018	14,63 ^b \pm 0,301
3	5	1,2363 ^b \pm 0,103	14,52 ^b \pm 2,284
4	7	1,3743 ^a \pm 0,056	13,86 ^b \pm 2,666
5	10	1,4132 ^a \pm 0,026	9,39 ^c \pm 1,508
6	12	1,4167 ^a \pm 0,013	9,45 ^c \pm 0,766
7	15	1,4185 ^a \pm 0,013	6,71 ^{cd} \pm 0,572
8	17	1,4195 ^a \pm 0,007	6,53 ^{cd} \pm 0,117
9	20	1,437 ^a \pm 0,007	4,83 ^{de} \pm 0,597
10	22	1,4326 ^a \pm 0,007	4,23 ^{dh} \pm 0,672
11	25	1,435 ^a \pm 0,005	4,47 ^{dg} \pm 0,376
12	27	1,4302 ^a \pm 0,012	4,48 ^{df} \pm 0,306
13	30	1,4327 ^a \pm 0,016	3,73 ^{di} \pm 0,633
14	35	1,4296 ^a \pm 0,004	3,2 ^{efghi} \pm 0,361
15	40	1,4063 ^a \pm 0,024	2,73 ^{efghi} \pm 0,194
16	45	1,4061 ^a \pm 0,036	2,44 ^{efghi} \pm 0,326

*Média \pm DP seguida de letras iguais/coluna não diferem estatisticamente em nível de 5 % (Teste de Tukey). Atividade da enzima livre 15,22 U/mg; suporte imobilizado 0,05 g e 2,5 mL de substrato ONPG 3 mM.

4.3.1.2 Avaliação da distribuição de β – galactosidase imobilizada na estrutura do PU

A Tabela 25 demonstra os resultados obtidos da análise da distribuição da enzima na estrutura do PU, após a polimerização (Figura 14), dividida em três partes longitudinais (A, B e C). Observou-se que a porção de enzima imobilizada referente à parte inferior (ensaio 3) apresentou maior atividade (11,82 U/g) com diferença significativa ($p < 0,05$) das demais frações. Demonstrando, que durante a formação da matriz a enzima tende a se depositar no fundo do recipiente.

Tabela 25 – Avaliação da distribuição de β – galactosidase na estrutura da matriz de PU, por corte longitudinal individual.

Ensaio	Corte longitudinal	Atividade de β – galactosidase (U/g)*	RI (%)*
1	Superior	8,82 ^b ± 0,851	52,16 ^b ± 5,03
2	Médio	9,69 ^b ± 0,249	57,27 ^b ± 1,47
3	Inferior	11,82 ^a ± 0,631	69,90 ^a ± 3,73

*Média ± DP seguida de letras iguais/coluna não diferem estatisticamente em nível de 5 % (Teste de Tukey). Atividade da enzima livre 17,71 U/mg; suporte imobilizado 0,05 g e 2,5 mL de substrato ONPG 3 mM; tempo de reação 7 min.

Corroborando com os resultados apresentados na Tabela 25, a Tabela 26 demonstra a avaliação individual de todos os quadrantes estudados (12 ensaios).

Tabela 26 – Avaliação da distribuição de β – galactosidase na estrutura da matriz de PU, por quadrante individual.

Ensaio	Atividade de β – galactosidase (U/g)*	RI (%)*
1	8,91 ^c ± 0,135	52,67 ^c ± 0,796
2	8,23 ^c ± 0,636	48,64 ^c ± 3,762
3	8,99 ^c ± 0,404	53,12 ^c ± 2,386
4	9,10 ^b ± 0,148	53,82 ^b ± 0,874
5	9,38 ^b ± 0,058	55,44 ^b ± 0,343
6	9,70 ^b ± 1,515	57,34 ^b ± 8,956
7	9,69 ^b ± 0,391	57,29 ^b ± 2,311
8	9,18 ^b ± 0,458	54,25 ^b ± 2,706
9	11,58 ^{ab} ± 0,026	68,47 ^{ab} ± 0,153
10	12,74 ^a ± 0,903	75,34 ^a ± 5,338
11	12,65 ^a ± 0,921	74,80 ^a ± 5,445
12	11,64 ^{ab} ± 0,080	68,82 ^{ab} ± 0,473

*Média ± DP seguida de letras iguais/coluna não diferem estatisticamente em nível de 5 % (Teste *t* -Student). Atividade da enzima livre 17,71 U/mg; suporte imobilizado 0,05 g e 2,5 mL de substrato ONPG 3 mM; tempo de reação 7 min.

Verifica-se que as porções das frações inferiores da matriz de PU (ensaios 9,10, 11 e 12) apresentaram as maiores atividades de β – galactosidase de aproximadamente 12 U/g e

rendimentos de imobilização de cerca de 72 %. Com base nestes resultados, optou-se por utilizar amostras da matriz de PU triturada e homogeneizada das frações inferiores da matriz (ensaio 9,10, 11 e 12) para os ensaios subsequentes.

4.3.1.3 pH e temperatura ótimos da enzima imobilizada

A Tabela 27 apresenta a matriz do planejamento fatorial completo DCCR 2² (valores reais e codificados das variáveis independentes) e a resposta obtida para atividade de β – galactosidase imobilizada de *A. oryzae*.

Tabela 27 – Matriz do planejamento fatorial completo DCCR 2² (valores codificados e reais) e a resposta de atividade de β – galactosidase (U/g), para a caracterização parcial da enzima imobilizada de *A. oryzae*.

Ensaio	Variáveis independentes*		Atividade de β-galactosidase imobilizada (U/g)
	X ₁	X ₂	
1	-1 (4,0)	-1 (40)	4,64
2	1 (6,0)	-1 (40)	8,36
3	-1 (4,0)	1 (60)	5,46
4	1 (6,0)	1 (60)	9,41
5	-1,41 (3,6)	0 (50)	6,33
6	1,41 (6,4)	0 (50)	8,38
7	0 (5,0)	-1,41 (36)	8,25
8	0 (5,0)	1,41 (64)	10,10
9	0 (5,0)	0 (50)	11,06
10	0 (5,0)	0 (50)	12,23
11	0 (5,0)	0 (50)	12,18

*X₁= pH e X₂= temperatura (°C). Variável independente fixa: tempo (7 min). Atividade da enzima livre 15,22 U/mg; suporte imobilizado 0,05 g e 2,5 mL de substrato ONPG 3 mM; tempo de reação 7 min.

De acordo com a Tabela 27, observa-se que a máxima atividade de β – galactosidase imobilizada de *A. oryzae*, foi de 12,23 U/g, a 50°C e pH 5,0 (ensaio do ponto central), parâmetros de pH e temperatura semelhantes aos obtidos no estudo com a enzima livre (item 4.1.2), demonstrando que as condições ótimas não foram afetadas pela imobilização.

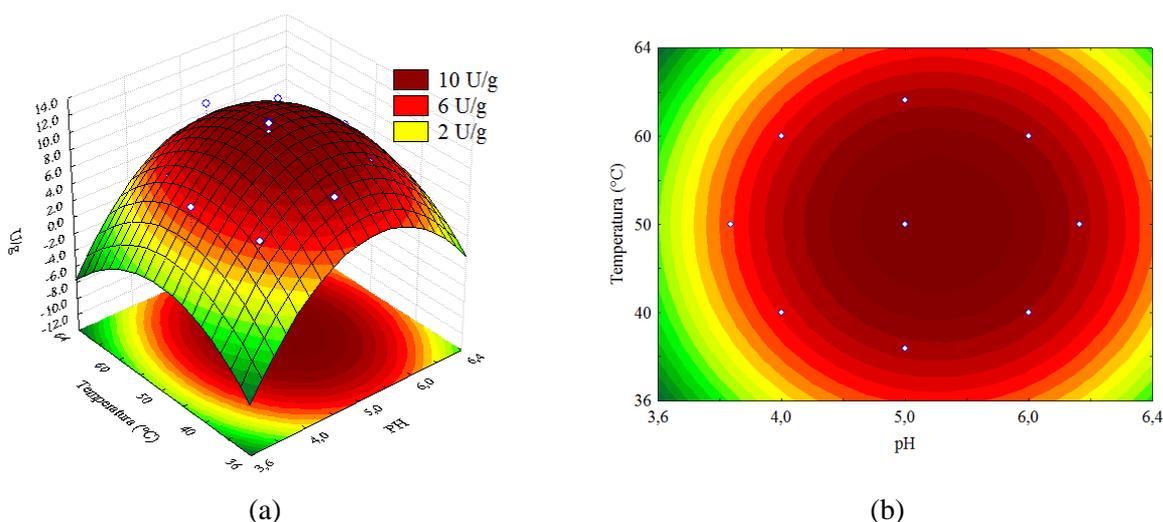
Os resultados da Tabela 27 foram tratados estatisticamente e a Tabela 28 (Apêndice A) apresenta o coeficiente de regressão, erro padrão, valores de t e p a um nível de confiança de 95 % das variáveis independentes, demonstrando que o pH e a temperatura exerceram efeito na atividade enzimática de β – galactosidase imobilizada de *A. oryzae*.

A Equação 13 apresenta o modelo codificado de segunda ordem, que descreve a atividade de β – galactosidases, em função das variáveis independentes, que exerceram efeito significativo ($p < 0,05$), dentro da faixa estudada. O modelo foi validado pela análise variância – ANOVA, conforme a Tabela 29 (Apêndice A), onde o coeficiente de correlação foi de 0,90 e o F calculado foi 2,05 vezes superior ao F tabelado, o qual permitiu também a construção da superfície de resposta e curva de contorno (Figura 25). Os efeitos que não foram significativos foram adicionados à falta de ajuste para análise de variância (Tabela 29 – Apêndice A).

$$B - gal (U/g) = 11,83 + 1,32 pH - 2,57 pH^2 - 1,66 T^2 \quad (13)$$

Onde *B – gal* é a atividade de β – galactosidase imobilizada de *A. oryzae* (U/g) e T é a temperatura (°C).

Figura 25 – Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para atividade de β – galactosidase imobilizada de *A. oryzae* (U/g), obtida em função do pH e a temperatura (°C).



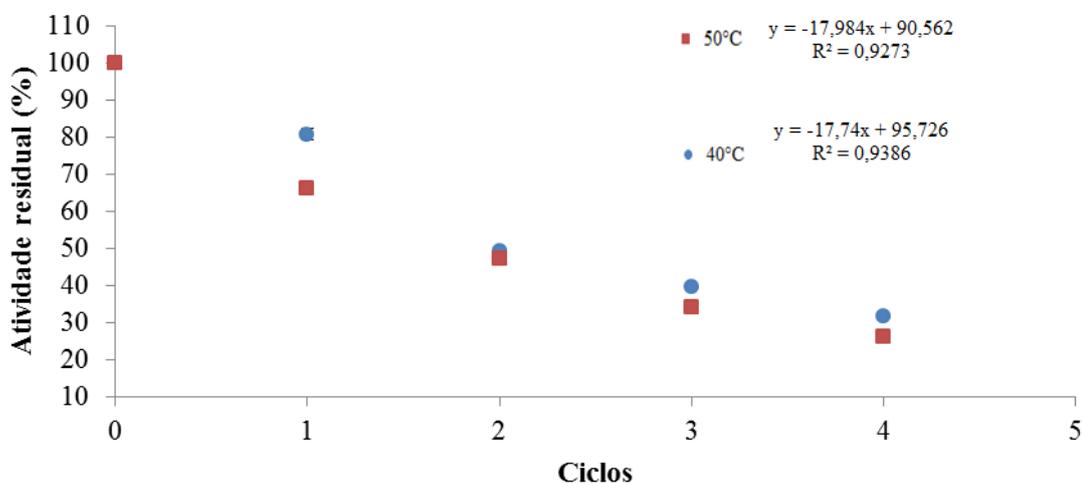
Fonte: O autor (2015).

Na Figura 25, verifica-se que o pH e a temperatura (°C) ótimos estão na faixa próxima ao pH 5,0 e temperaturas de 50°C. Estes valores de pH e temperatura (°C) foram selecionados para os estudos posteriores.

4.3.1.4 Reutilização de β – galactosidase imobilizada

A Figura 26 apresenta os ciclos de utilização da enzima β – galactosidase de *A. oryzae* nas temperaturas de 40 e 50°C. Observou-se uma perda gradativa da atividade residual ao longo dos ciclos, apresentando no terceiro ciclo, aproximadamente 40 % da atividade inicial, em ambas as temperaturas. Foi efetuado o estudo a 40°C por ser a faixa de temperatura da hidrólise do soro (ESCOBAR, DE SOUZA, LEHN, 2014), enquanto que a 50 °C foi a temperatura das condições otimizadas no presente estudo (item 4.3.1.3).

Figura 26 – Reciclos de utilização de β – galactosidase de *A. oryzae* imobilizada em suporte de PU nas temperaturas de 40 e 50°C.



Fonte: O autor (2015).

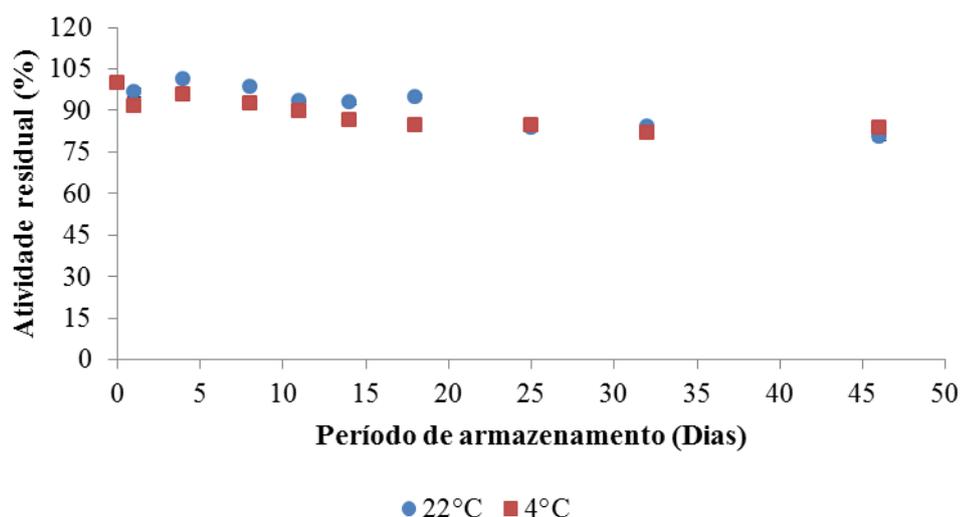
A enzima β – galactosidase de *A. oryzae* imobilizada em suporte de PU apresenta vantagens, pois permite uma economia de processo de hidrólise da lactose oriunda de soro de leite, pela possibilidade de reutilização da enzima imobilizada por aproximadamente 3 ciclos e também o fato de reaproveitar um subproduto.

Shen *et al.* (2011), ao imobilizar a β – galactosidase de *K. lactis* em matriz de alginato, gelatina e fosfato de cálcio, referem que a atividade residual manteve-se acima de 60% após o vigésimo ciclo de utilização, e cerca de 90% depois de 30 dias de armazenamento.

4.3.1.5 Estabilidade de β – galactosidase imobilizada

A Figura 27 ilustra a estabilidade de β – galactosidase imobilizada em suporte de PU, avaliada em temperaturas de 4 e 22°C.

Figura 27 – Estabilidade da β – galactosidase de *A. oryzae* imobilizada em suporte de PU nas temperaturas de 4 e 22 °C.



Fonte: O autor (2015).

Verificou-se que a enzima imobilizada na matriz apresentou comportamento estável, com atividade residual superior a 80%, em 46 dias de armazenamento nas temperaturas de 4 e 22°C (experimento em andamento). Este fato pode ser decorrente do aumento da estabilidade do catalisador ou modificações na estrutura do suporte, o que pode favorecer na estabilidade do imobilizado (FERNANDES *et al.*, 2014; DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004).

Fernandes (2013), estudou a imobilização da lipase CalB em PU e verificou a estabilidade de 74 dias, a 22 e 4°C. Verificou também que, a enzima imobilizada apresenta a

cada ciclo um decréscimo na atividade e após 4 ciclos de reação a atividade residual passou a ser 12,9 %, semelhante ao encontrado no presente estudo.

Ansari *et al.* (2014) estudaram a imobilização de β -galactosidase de *A. oryzae* em membrana de celulose acetato-polimetilmetacrilato (CA-PMMA) e sua aplicação na hidrólise da lactose em produtos lácteos. O estudo foi realizado através de reatores em batelada a 50°C para a enzima livre e imobilizada. O pH ótimo para ambas foi o mesmo (pH 4,5), sendo que a imobilizada reteve mais atividade catalítica em maiores e menores faixas de pH. A temperatura ótima para a enzima imobilizada foi aumentada em 10 C. A estabilidade da enzima livre e imobilizada, após 35 dias de armazenamento a 4°C, foi de 45 e 83 %, respectivamente. A possibilidade de reutilizar a β – imobilizada foi 86 % após o 5 ciclo repetido.

Rejikumar e Surekha (2001) avaliaram o processo de hidrólise de lactose e soro de leite a partir de β – galactosidase de *A. oryzae* imobilizada em quitosana reticulada com poli (vinil álcool). As condições otimizadas do processo foram 50°C, pH 5,0, atingindo um percentual de conversão de lactose de 95 %, com até 20 ciclos de utilização.

Zhou e Chen (2001) estudaram a β – galactosidase de *K. lactis*, imobilizada em superfície de grafite, usando glutaraldeído como reagente de ligação cruzada. O rendimento de atividade variou entre 17 % e 25 %, enquanto que a carga de enzima foi de 1,8 e 1,1 U/cm² na superfície externa do grafite, respectivamente. A atividade decresceu com o aumento da carga de enzima. O grau de hidrólise da lactose foi de aproximadamente 70 % a 37°C ao longo de 3 h.

5 CONCLUSÕES

Neste trabalho, foi efetuado um *screening* de suportes para a imobilização das enzimas β – galactosidases comerciais, oriundas de *Kluyveromices lactis* e *Aspergillus oryzae*. Foram estudadas as matrizes de alginato/gelatina/fostato de cálcio (AGPCa), alginato de sódio e carvão ativado, poliuretano (PU) e poli(hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) (PHBV), bem como a caracterização, avaliação dos rendimentos, estabilidade e reuso.

Realizou-se a caracterização parcial das enzimas livres em termos de tempo de reação, pH e temperatura ótimos e parâmetros cinéticos de K_m e $V_{m\acute{a}x}$. Para a enzima de *K. lactis*, o melhor tempo de reação foi de 5 min, pH e temperatura ótimos de 7,0 e 16°C, respectivamente (597,13 U/mL). Os parâmetros cinéticos, a partir de ONPG foram K_m de 7,58 mM e $V_{m\acute{a}x}$ 833,33 U/mL. Para a β – galactosidase de *A. oryzae* o tempo de reação foi de 20 min, pH e temperatura ótimos na faixa de 5,0 e 50°C, respectivamente (14,83 U/mg), K_m de 1,83 mM e $V_{m\acute{a}x}$ 24,39 U/mg, nas mesmas condições da enzima de *K. lactis*.

Na imobilização da enzima de *K. lactis* foram estudados todos os suportes. Para a matriz de AGPCa definiu-se a quantidade de enzima a ser adicionada ao suporte como 0,5 mL, com atividade de 0,25 U/g. Tanto a matriz de AGPCa, quanto o experimento controle (AH₂O) não apresentaram rendimentos de imobilização expressivos (0,34 e 0,59%, respectivamente). As esferas deste suporte foram armazenadas a seco, a 4°C, devido ao intumescimento e degradação. O tempo para a dosagem de atividade da enzima imobilizada foi de 20 min, com rendimento de 0,50%. O tampão para compor a matriz polimérica foi o tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,5. O planejamento fatorial completo, envolvendo o alginato de sódio e CaCl₂ pouco incrementaram a atividade enzimática, onde o melhor ensaio foi com 0,16 g e 85 mM, respectivamente (0,48 U/g), porém devido à quantidade reduzida de alginato, as esferas tendiam à rápida degradação e neste caso, utilizou-se a faixa do ponto central (0,2 g de alginato de sódio e 85 mM CaCl₂) para o estudo do tempo de reação, após as condições otimizadas, o qual não incrementou a atividade enzimática e rendimento da imobilização. As maiores atividades ocorreram em 5 min, com 0,47 U/g e 1,39% de rendimento.

Dos componentes do suporte de AGPCa, o cloreto de cálcio, a 75 mM inativava completamente a enzima. O cloreto de manganês e o cloreto e o nitrato de magnésio, na mesma molaridade não exibiram este comportamento, porém ao testar concentrações maiores para possibilitar a formação das esferas, a enzima sofreu inativação. Dessa forma o suporte de imobilização não foi adequado para a imobilizar a β – galactosidase de *K. lactis*.

As matrizes de alginato de sódio/carvão ativado e poliuretano, para a enzima *K. lactis*, também não possibilitaram a imobilização eficiente, pois não ocorreu a hidrólise do ONPG na reação da medida de atividade, para ambos os suportes.

No suporte de PHBV, ainda com a β – galactosidase de *K. lactis* foi possível a imobilização. A enzima diluída em tampão fostato de sódio 100 mM pH 7,0 apresentou cerca de 458 U/g e 5 % de rendimento de imobilização, porém ainda considerado insuficiente.

Dessa forma, estudou-se a imobilização em suporte de PU, da β – galactosidase de *A. oryzae* e foi possível verificar que em 0,005 g de enzima liofilizada, um tempo de reação de 7 min, quantidades de 0,05 g da matriz imobilizada e 2,5 ml de ONPG para a reação de atividade, apresentaram cerca de 14 U/g e rendimento superior a 75 %. Sendo que, a distribuição da enzima se concentra mais na parte inferior da matriz, com diferenças significativas ($p < 0,05$).

O pH e temperatura ótimos da enzima de *A. oryzae* imobilizada não sofreram alteração em comparação à enzima livre e foi possível 3 ciclos, com 40% de atividade residual, nas condições otimizadas, a 40 e 50°C. A estabilidade, avaliada nas temperaturas de 4 e 22 °C apresentou atividade relativa superior a 80% após 46 dias de armazenamento.

5.1 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Tendo com base a experiência adquirida e os resultados obtidos no presente estudo, as seguintes sugestões para trabalhos futuros podem ser delineadas:

- Aplicar o suporte de PU com a β – galactosidase de *A. oryzae* em produtos lácteos para verificar a hidrólise da lactose.
- Estudar a formação de GOS a partir da enzima livre e imobilizada;
- Medir a estabilidade a altas temperaturas;
- Avaliar a eficiência da enzima imobilizada em sistema reacional de fluxo contínuo.

REFERÊNCIAS

ALBAYRAK, N.; YANG, S. T. Immobilization of *Aspergillus oryzae* β -galactosidase on tosylated cotton cloth. **Enzyme Microbiology Technology**, v. 31, p. 371-383, 2002.

ANDRADE, V. T.; BRANDÃO, S. C. C.; ALVIM, T. C. Sorvete de doce de leite delactosado. In: XXI CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS, 2004, Juiz de Fora. **Anais. Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 59, n. 339, p. 126-130, 2004.

ANSARI, S. A.; HUSAIN, Q. Bioaffinity based immobilization of almond (*Amygdalus communis*) β -galactosidase on Con A-layered calcium alginatecellulose beads: Its application in lactose hydrolysis in batch and continuous mode. **Iranian Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 4, p. 290-301, 2011.

ANSARI, S. A.; HUSAIN, Q. Potential applications of enzymes immobilized on/in nano materials: A review. **Biotechnology Advances**, v. 30, p. 512–523, 2012.

ANSARI, S. A.; HUSAIN, Q.; QAYYUM, S.; AZAM, A. Designing and surface modification of zinc oxide nanoparticles for biomedical applications. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, p. 2107–2115, 2011.

ANSARI, S. A.; SATAR, R.; ZAIDI, S. K.; AHMAD, A. Immobilization of *Aspergillus oryzae* β -Galactosidase on Cellulose Acetate-Polymethylmethacrylate Membrane and its Application in Hydrolysis of Lactose from Milk and Whey. **International Scholarly Research Notices**, v. 2014, p. 6, 2014.

BELHACENE, K.; GROSU, E. F.; BLAGA, A. C.; DHULSTER, P.; PINTEALA, M.; FROIDEVAUX, R. Simple eco-friendly β -galactosidase immobilization on functionalized magnetic particles for lactose hydrolysis. **Environmental Engineering and Management Journal**, v. 14, n. 3, p. 631-638, 2015.

BERSET, C. Enzimas imobilizadas. In: SCRIBAN, R. (Coord.). **Biotecnologia**. São Paulo: Manole, 1985, cap.3, p. 220 – 237.

BLANDINO, A.; MACIAS, M.; CANTERO, D. Immobilization of glucose oxidase within calcium alginate gel capsules. **Process Biochemistry**, v. 36, p. 601-606, 2001.

BRAGA, A. C. R.; SILVA, M. F.; DE OLIVEIRA, J. V.; TREICHEL, H.; KALIL, S. J. A. New approach to evaluate immobilization of β – galactosidase on Eupergit® C: structural, kinetic, and thermal characterization. **Química Nova**, v. 37, n. 5, p. 796-803, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº. 205. Enzimas e Preparações Enzimáticas para Uso na Produção de Alimentos Destinados ao Consumo Humano. **Diário Oficial da União**, Brasília, 14 nov., 2006.

BRUM, S. S.; BIANCHI, M. L.; DA SILVA, V. L.; GONÇALVES, M.; GUERREIRO, M. C.; DE OLIVEIRA, L. C. A. Preparação e caracterização de carvão ativado produzido a partir de resíduos do beneficiamento do café. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p.1048-1052, 2008.

BUKHARI, A.; IDRIS, I.; ATTA, M.; LOONG, T. C. Covalent immobilization of *Candida antarctica* lipase B on nanopolystyrene and its application to microwave-assisted esterification. **Chinese Journal of Catalysis**, v. 35, p. 1555–1564, 2014.

BUSTAMANTE-VARGAS, C. E.; DE OLIVEIRA D.; NYARI, N. L. D.; VALDUGA, E.; SOARES, M. B. A.; BACKES, G. T.; DALLAGO, R. M. In situ immobilization of commercial pectinase in rigid polyurethane foam and application in the hydrolysis of pectic oligosaccharides. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 122, p.35 – 43, 2015a.

BUSTAMANTE-VARGAS, C. E.; MIGNONI, M. L.; DE OLIVEIRA, D.; VENQUIARUTO, L. D.; VALDUGA, E.; TONIAZZO, G.; DALLAGO, R. M. Synthesis of a hybrid polymer-inorganic biomimetic support incorporating in situ pectinase from *Aspergillus niger* ATCC 9642. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 38, n. 8, p. 1569-77, 2015.

CAO, L. Immobilised enzymes: science or art: Current Opinion. **Chemical Biology**, v. 9, p. 217–226, 2005.

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

CASTRO, C. S.; GUERREIRO, M. C.; DE OLIVEIRA, L. C. A.; GONÇALVES, M. Remoção de compostos orgânicos em água empregando carvão ativado impregnado com óxido de ferro: ação combinada de adsorção e oxidação em presença de H₂O₂. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1561-1565, 2009.

CEZAR, F. M.; FARIÑA, L. O.; DRUNKLER, D. A.; COSTA, M. C. D. Desenvolvimento de iogurte com lactose reduzida para pacientes intolerantes por meio da fermentação e adição de lactase. In: XXII CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS, 2005, Juiz de Fora. **Anais. Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 60, n. 345, p. 29-38, 2005.

DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M. G.; SOLDI, V. Aplicação de lipases imobilizadas em polímeros. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 623-630, 2004.

DATTA, S.; CHRISTENA, L.; RAJARAM, Y. Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. **3 Biotech**, v. 3, p. 1-9, 2013.

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

DI SERIO, M.; MATURA, C.; DE ALTERIIS, E.; PARASCANDOLA, P.; TESSER, R.; SANTACESARIA, E. Lactose hydrolysis by immobilized β -galactosidase: the effect of the supports and kinetics. **Catalysis Today**, v.79-80, p. 333-339, 2003.

ELNASHAR, M. M. M.; KAHIL, T. Biopolymeric formulations for biocatalysis and biomedical applications. **Biomed Research International**, v. 2014, p. 10, 2014.

ESCOBAR, G. P.; DE SOUZA, C. F. V.; LEHN, D. N. Avaliação de β – galactosidase livre e imobilizada na hidrólise da lactose do permeado de soro de queijo. **Caderno Pedagógico, Lajeado**, v. 11, n. 1, p. 117-129, 2014.

EVANGELISTA, J. **Tecnologia de Alimentos**. 2. Ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2000.

FAI, A. E. C.; PASTORE, G. M. Galactooligossacarídeos: produção, benefícios à saúde, aplicação em alimentos e perspectivas. **Scientia Agropecuaria**, v. 6, n. 1, p. 69-81, 2015.

FAJARDO-OCHOA, R.; OSUNA-CASTRO, J.; VELÁZQUEZ-MENDOZA, C.; ESCALANTE-MINAKATA, P.; IBARRA-JUNQUERA, V. Inmovilización de células y enzimas. **Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila**, v. 3, n. 6, p. 42-56, 2011.

FERNANDES, I. A. **Estudo da imobilização de lipases utilizando poli-hidroxibutirato-co-hidrovalerato (PHBV) e poliuretano (PU) como suportes.** 2013. 131f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, URI, Erechim, 2013.

FERNANDES, I. A.; NYARI, N. L. D.; DE OLIVEIRA, J. V.; RIGO, E.; DE SOUZA, M. C. M.; GONÇALVES, L. R. B.; PERGHERE, S. B. C.; DE OLIVEIRA, D. Nanopartículas de poli-hidroxibutirato-co-valerato como suporte para a imobilização da lipase de *Candida antarctica* fração B. **Química Nova**, v. 37, n. 2, p. 331-336, 2014.

FERNANDES, I. A.; NYARI, N. L. D.; FICANHA, A. M. M.; PAULAZZI, A. R.; ZENI, J.; DALLAGO, R. M. **Efeito da estabilidade de estocagem da lipase comercial de *Candida antarctica* B (calB) na forma livre e imobilizada por confinamento em suporte de poliuretano.** In: XX CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA – COBEQ. Florianópolis, 2014a.

FRANCESCHI, E. **Precipitação e encapsulamento de β -caroteno em PHBV empregando tecnologia supercrítica.** Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC, Florianópolis, 2009.

FREITAS, F. F. **Otimização do processo de imobilização de β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* em alginato de sódio com gelatina e glutaraldeído.** 2007. 228 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Uberlândia, UFU, Uberlândia, 2007.

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, F. F.; MARQUEZ, L. D. S.; RIBEIRO, G. P.; BRANDÃO, G. C.; CARDOSO, V. L. RIBEIRO, E. J. Optimization of the immobilization process of β -galactosidase by combined entrapment-cross-linking and the kinetics of lactose hydrolysis. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 29, n. 01, p. 15 - 24, 2012.

GÄNZLE, M. G.; HAASE, G.; JELEN, P. Lactose: crystallization, hydrolysis and value-added derivatives. **International Dairy Journal**, v. 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.

GEKAS, V.; LÓPEZ-LEIVA, M. Hydrolysis of lactose: a literature review, **Process Biochemistry**, v. 20, p. 2-12, 1985.

GIRELLI, A. M.; MATTEI, E. Application of immobilized enzyme reactor in on-line high performance liquid chromatography: a review. **Journal of Chromatography B**, v. 819, n. 1, p. 3-16, 2005.

GROSOVÁ, Z.; ROSENBERG, M.; REBROŠ, M. Perspectives and applications of immobilised β – galactosidase in food industry – a Review. **Czech Journal of Food Science**, v. 26, n. 1, p. 1–14, 2008.

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

GUNCHEVA, M.; TASHEV, E.; ZHIRYAKOVA, D.; TOSHEVA, T.; TZOKOVA, N. Immobilization of lipase from *Candida rugosa* on novel phosphorous-containing polyurethanes: Application in wax ester synthesis. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 923-930, 2011.

HAIDER, T.; HUSAIN, Q. Hydrolysis of Milk/whey Lactose by β – galactosidase: A Comparative Study of Stirred Batch Process and Packed Bed Reactor Prepared with Calcium Alginate Entrapped Enzyme. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, v. 48, p. 576–580, 2009.

HARJU, M.; KALLIOINEN, H.; TOSSAVAINEN, O. Lactose hydrolysis and other conversions in dairy products: Technological aspects. **International Dairy Journal**, v. 22, p.104-109, 2012.

HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A., Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 235-251, 2006.

HOLSINGER, V. H. Physical and chemical properties of lactose. In: FOX, P. F. **Lactose, water, salts and vitamins**. London: Advanced Dairy Chemistry, v. 3, p. 1-38, 1997.

HUSAIN, Q. β – galactosidases and their potential applications: A review. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 30, n. 1, p.41-62, 2010.

HUSAIN, Q.; ANSARI, S. A.; ALAM, F.; AZAM, A. Immobilization of *Aspergillus oryzae* β -galactosidase on zinc oxide nanoparticles via simple adsorption mechanism. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 49, n. 1, p. 37-43, 2011.

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

JURADO, E.; CAMACHO, F.; LUZÓN, G.; VICARIA, J. M. A new kinetic model proposed for hydrolysis of lactose by β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, n. 3, p. 300-309, 2002.

KATCHALSKI-KATZIR, E.; KRAEMER, D. M. Eupergit® C, a carrier for immobilization of enzymes of industrial potential. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 10, p. 157-176, 2000.

KEMPKA, A. **Desenvolvimento de matriz de imobilização de lipase utilizando gelatina de diferentes blooms adicionada de plastificantes hidrofílicos**. 2012. 209f. – Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC, Florianópolis, 2012.

KIELING, D. D. FÚRIGO-JÚNIOR, A. **Enzimas, aspectos gerais**. Centro Tecnológico Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Engenharia Química e de Alimentos, Florianópolis, 2002. Disponível em <<http://www.ebah.com.br/content/ABAAABp2UAG/enzimas-aspectos-gerais>>. Acesso em 01 de outubro de 2015.

KIM, C. S.; JI, E. S.; OH, D. K. Characterization of a thermostable recombinant β -galactosidase from *Thermotoga marítima*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 97, p. 1006–1014, 2014.

KIRK, O.; BORCHERT, T. V.; FUGLSANG, C. C. Industrial enzyme applications. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, p. 345 – 351, 2002.

KLEIN, M. P. **Imobilização de β -galactosidase para obtenção de produtos lácteos com baixo teor de lactose**. 2010. 92f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, 2010.

KLEIN, M. P.; DE JONG, E. V.; RÉVILLION, J. P. P. Utilização da β -galactosidase para prevenção da cristalização em doce de leite. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 34, n. 6, p. 1530-1535, 2010.

KLEIN, M. P.; NUNES, M. R.; RODRIGUES, R. C.; BENVENUTTI, E. V.; COSTA, T. M. H.; HERTZ, P. F.; NINOW, J. L. Effect of the support size on the properties of β -galactosidase immobilized on chitosan: advantages and disadvantages of macro and nanoparticles. **Biomacromolecules**, v. 13, n. 8, p. 2456–2464, 2012.

KRAJEWSKA, B. Application of chitin and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. **Enzyme Microbial Technology**, v. 35, p. 126-139, 2004.

KUMARASURIYAR, A.; JACKSON, R. A.; GRONDAHL, L.; TRAU, M.; NURCOMBE, V.; COOL, S. M. Poly(β -hydroxybutyrate-co- β -hydroxyvalerate) Supports *in Vitro* Osteogenesis. **Tissue Engineering**, v. 11, p. 7 – 8, 2005.

LEE, S. Y.; CHOI J.; WONG, H. H. Recent advances in polyhydroxyalkanoate production by bacterial fermentation: Minireview. **International Journal of Biological Micromolecules**, v. 25, p. 31–36, 1999.

LIMA, A. F.; CAVALCANTE, K. F.; DE FREITAS, M. de F.; RODRIGUES, T. H. S.; ROCHA, M. V. P.; GONÇALVES, L. R. B. Comparative biochemical characterization of soluble and chitosan immobilized β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* NRRL Y1564. **Process Biochemistry**, v. 48, p. 443–452, 2013.

LINWEAVER, H.; BURK, D. The determination of enzyme dissociation constants. **Journal of the American Chemical Society**, v. 56, p. 658-666, 1934.

LONGO, G. **Influência da adição de β -galactosidase na produção de iogurtes**. 2006. 89f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Paraná, UFPR, Curitiba, 2006.

LONGO, G.; WASZCZYNSKYJ, N. Avaliação de atributos sensoriais de leite UHT com baixo teor de lactose. **Revista Eletrônica Polidisciplinar Voos**, n. 2, p. 21 – 29, 2006.

MACEDO, G. A.; PASTORE, G. M.; SATO, H. H.; PARK, Y. G. K. **Bioquímica experimental de alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, 2005.

MAIA, J. L.; SANTANA, M. H. A.; RÉ, M. I. The effect of some processing conditions on the characteristics of biodegradable microspheres obtained by an emulsion solvent evaporation process. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 21, p. 1-12, 2004.

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

MARIOTTI, M. P.; YAMANAKA, H.; ARAUJO, A. R.; TREVISAN, H. C. Hydrolysis of whey lactose by immobilized β -Galactosidase. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 51 n. 6: p.1233-1240, 2008.

MARTINS, A. R.; BURKERT, C. A. V. Revisão: Galacto-oligossacarídeos (GOS) e seus efeitos prebióticos e bifidogênicos. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 12, n. 3, p. 230-240, 2009.

MENDES, A. A.; OLIVEIRA, P. C.; CASTRO, F. C.; GIORDANO, R. L. C. Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial. **Química Nova**, v. 34, n. 5, p. 831-840, 2011.

MILETIC, N.; NASTASOVIC, A.; LOOS, K. Immobilization of biocatalysts for enzymatic polymerizations: Possibilities. **Bioresource Technology**, v. 115, p. 126-135, 2012.

MITCHELL, D. T.; LEE, S. B.; TROFIN, L.; L. I. N.; NEVANEN, T. K.; SÖDERLUND, H.; MARTIN, C. Smart Nanotubes for Bioseparations and Biocatalysis. **Journal of the American Chemical Society**, v.124, p.11864–11865, 2002.

MLICHOVÁ, Z.; ROSENBERG, M. Current trends of β – galactosidase application in food technology. **Journal of Food and Nutrition Research**, v. 45, n. 2, p. 47-54, 2006.

NAGY, G. N.; KISS, T. N.; SZENTIRMAI, A.; BIRO, S. β – galactosidase of *Penicillium chrysogenum*: Production, Purification, and Characterization of the Enzyme. **Protein Expression and Purification**, v. 21, p. 24–29, 2001.

NICHELE, V.; SIGNORETTO, M.; GHEDNI, E. β – galactosidase entrapment in silica gel matrices for a more effective treatment of lactose intolerance. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 71, p. 10-15, 2011.

NUMANOGLU, Y.; SUNGUR, S. β – galactosidase from *Kluyveromyces lactis* cell disruption and enzyme immobilization using a cellulose–gelatin carrier system. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 703–709, 2004.

NYARI, N. L. D.; FERNANDES, I. A.; ZENI, J.; MOREIRA, A. M.; DE OLIVEIRA, J. V., DE OLIVEIRA, D. RIGO, E. **Aplicação da lipase *Candida antarctica* B imobilizada em PHBV e PU na catálise de reações de síntese** In: XX CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA – COBEQ. Florianópolis, 2014.

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

PAN, C.; HU, B.; LI, W.; SUN, Y.; YE, H.; ZENG, X. Novel and efficient method for immobilization and stabilization of β – D – galactosidase by covalent attachment onto magnetic Fe₃O₄–chitosan nanoparticles. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 61, p. 208 – 215, 2009.

PANESAR, P. S.; KUMARI, S.; PANESAR, R. Potential Applications of Immobilized β - Galactosidase in Food Processing Industries. **Enzyme Research**, v. 2010, p. 1-16, 2010.

PERINI, B. L. B. **Produção de β – Galactosidase com *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 a partir de soro de queijo**, 2013. 79 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos) Universidade da Região de Joinville, UNIVILLE, Joinville, 2013.

PESELA, B. C. C.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; FUENTES, M.; VIÁN, A.; GARCÍA, J. L.; CARRASCOSA, A. V.; MATEO, C.; GUIÁN, J. M. Reversible immobilization of a thermophilic β – galactosidase via ionic adsorption on PEI-coated Sepabeads. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 32, p. 369–374. 2003b.

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

PESELA, B. C. C.; DELLAMORA-ORTIZ, G.; BETANCOR, L.; FUENTES, M.; GUIAN, M.J.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Modulation of the catalytic properties of multimeric β – galactosidase from *E. coli* by using different immobilization protocols. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 310-315. 2007.

PINTOS, T. H. C.; PRIETO, L. M.; PORTO, V. S.; MAZUTTI, M.; BURKERT, C. A. V. Influência da concentração de carvão ativado na adsorção de β – galactosidase. **Biochemistry and Biotechnology Reports**, v. 2, n. 3, p. 98-101, 2013.

PRAZERES, A. R.; CARVALHO, F.; RIVAS, J. Cheese whey management: A review. **Journal of Environmental Management**, v. 110, p. 48-68, 2012.

RAFAEL, R. S. **Imobilização de β – galactosidase através de Ligações covalentes multipontuais em suporte contendo grupamentos epóxi**. 2014. 71f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Unidade Integrada Vale do Taquari de Ensino Superior, UNIVATES, 2014.

REJIKUMAR, S.; SUREKHA, D. Hydrolysis of lactose and milk whey using a fixed-bed reactor containing β – galactosidase covalently bound onto chitosan and cross-linked poly (vinyl alcohol). **International Journal of Food Science and Technology**, v. 36, p. 91-98, 2001.

RICHARD, H. Enzimologia e Biocatálise. In: SCRIBAN, R. (Coord.). **Biotecnologia**. São Paulo: Manole, 1985, cap.1, p. 179-207.

RICHETTI, A.; MUNARETTO, C. B.; LERIN, L. A.; BATISTELLA, L.; DE OLIVEIRA, J. V.; DALLAGO, R. M.; ASTOLFI, V.; DI LUCCIO, M.; MAZZUTTI, M. A.; OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H. Immobilization of inulinase from *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 using modified sodium alginate beads. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 35, p. 383-388, 2012.

ROUSSEAU, I.; LE CERF, D.; PICTON, L.; ARGILLIER, J. F.; MULLER, G. Entrapment and release of sodium polystyrene sulfonate (SPS): from calcium alginate gel beads. **European Polymer Journal**, v. 40, p. 2709– 2715, 2004.

ROY, I.; GUPTA M. N.; Hydrolysis of starch by a mixture of glucoamylase and pullulanase: entrapped individually in calcium alginate beads. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 34, p. 26-32, 2004.

SANTIAGO, R.; FERNÁNDEZ-MAYORALAS, A.; GARCÍA-JUNCEDA, E. Enzymatic synthesis of disaccharides by β – galactosidase-catalyzed glycosylation of a glycocluster. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 11, p. 71-79. 2000.

SANTIN, C. M. T.; SCHERER, R. P.; NYARI, N. L. D.; ROSA, C. D.; DALLAGO, R. M.; DE OLIVEIRA, D.; DE OLIVEIRA, J. V. Batch esterification of fatty acids charges under ultrasound irradiation using *Candida antarctica* B immobilized in polyurethane foam. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 87, p. 234-240, 2014.

SANTOS, J. C. C. **Imobilização da enzima glicose oxidase em filmes nanoestruturados para aplicação em biossensores.** 2012. 94f. Dissertação (Mestrado em Física) - Instituto de Física de São Carlos, USP, São Carlos, 2012.

SASSOLAS, A.; BLUM, L. J.; LECA-BOUVIER, B. D. Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 3, p. 489-511, 2012.

SENDIL, D.; GÜRSEL, I.; WISE, D. L.; HASIRCI, V. Antibiotic release from biodegradable PHBV microparticles. **Journal of Controlled Release**, v. 59, p. 207-217, 1999.

SHELDON, R. A.; VAN PELT, S. Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 15, p. 6223-35, 2013.

SHELKE, N. B.; NAGARALE, R. K.; KUMBAR, S. G. Polyurethanes. In: **Natural and Synthetic Biomedical Polymers**, c. 7, p. 123–144, 2014.

SHEN, Q.; YANGA, R.; HUA, X.; YE, F.; ZHANG, W.; ZHAO, W. Gelatin-templated biomimetic calcification for β – galactosidase immobilization, **Process Biochemistry**, v. 46, p. 1565–1571, 2011.

SILVA, M. F.; RIGO, D.; MOSSI, V.; DALLAGO, R. M.; HENRICK, P.; KUHN, G. O.; DALLA ROSA, C.; DE OLIVEIRA, D.; DE OLIVEIRA, J. V.; TREICHEL, H. Evaluation of enzymatic activity of commercial inulinase from *Aspergillus niger* immobilized in polyurethane foam. **Food and Bioproducts Processing**, v. 91, p. 54-59, 2013.

SILVA, V. D. M.; DE MARCO, L. M.; DELVIVO, F. M.; COELHO, J. V.; SILVESTRE, M. P. C. Imobilização da pancreatina em carvão ativado e em alumina para o preparo de hidrolisados de soro de leite. **Acta Scientiarum. Health Sciences**, v. 27, n. 2, p. 163-169, 2005.

SONG, C.; LIU, G. L.; XU, J. L.; CHI, Z. M. Purification and characterization of extracellular β – galactosidase from the psychrotolerant yeast *Guehomyces pullulans* 17-1 isolated from sea sediment in Antarctica, **Process Biochemistry**, v. 45, n. 6, p. 954–960, 2010.

SONG, Y. S.; SHIN, H. Y.; LEE, J. Y.; PARK, C.; KIM, S. W. β – galactosidase immobilised microreactor fabricated using a novel technique for enzyme immobilisation and its application for continuous synthesis of lactulose. **Food Chemistry**, v.133, p. 611–617, 2012.

SZCZODRAK, J. Hydrolysis of lactose in whey permeate by immobilized β – galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 10, p. 631-637, 2000.

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

TOMAL, A. A. B.; CUNHA, M. E. T.; BOSSO, A.; YOUSSEF, E. Y.; SUGUIMOTO, H. H. Avanços tecnológicos na obtenção, purificação e identificação de galacto-oligosacarídeos e estudo de suas propriedades prébióticas. **UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 12, n. 4, p. 41-9, 2010.

TREMARIN, A. **Condições operacionais na hidrólise enzimática da lactose em reator a membrana**. 2007. 104f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.

TRONCO, V. M. **Manual para inspeção da qualidade do leite**. Santa Maria: Ed. Da UFSM, 2003. 192 p.

VIEIRA, D. C. **Imobilização da enzima β – galactosidase em agarose e quitosana utilizando diferentes protocolos de ativação**. 2009. 115 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de São Carlos, UFSCar, São Carlos, 2009.

VILAR, W. D. **Química e tecnologia dos poliuretanos**. Disponível em <<http://www.poliuretanos.com.br/Cap2/24Surfactantes.htm#mecanismo>>. Acesso em 20 de Julho de 2015.

VITOLO, M. Aplicação de enzimas na Tecnologia de Alimentos. In: AQUARONE, E.; BORZANI, W. SCHMIDELL, W e LIMA, U.de A. **Biotecnologia Industrial**. São Paulo, Edgard Blücher Ltda, v. 4, p. 387-420, 2001.

VOET, D.; VOET, J. G.; PRATT, C. W. **Fundamentos de bioquímica**. Porto Alegre: Artmed, 2002.

ZANIN, G. M.; MORAES, F. F., **Enzimas como Agentes Biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Ed. Legis Summa, c. 4, p. 35-85, 2004.

ZHOU, Q. Z. K.; CHEN, X. D.; Immobilization of β -galactosidase on graphite surface by glutaraldehyde. **Journal of Food Engineering**, v. 48, p. 69-74, 2001.

APÊNDICE A

Tabela 6 – Coeficiente de regressão, erro padrão, valores de p e t do planejamento fatorial completo DCCR 2² para atividade enzimática de β – galactosidase livre de *K. lactis* (U/mL).

	Coeficientes de regressão	Erro puro	t(5)	p
Média*	576,209	4,538565	126,9584	0,000062
pH (L)*	52,276	2,783468	18,7810	0,002823
pH (Q)*	-306,110	3,321402	-92,1629	0,000118
Temperatura (L)*	-119,338	2,783468	-42,8737	0,000544
Temperatura (Q)*	-132,439	3,321402	-39,8745	0,000628
pH (L) x T (L)*	-62,425	3,930559	-15,8820	0,003941

*Fatores estatisticamente significativos (p<0,05).

Tabela 7 – Coeficiente de regressão, erro padrão, valores de p e t do planejamento fatorial completo DCCR 2² para atividade enzimática de β – galactosidase livre de *A. oryzae* (U/mg).

	Coeficientes de regressão	Erro puro	t(5)	p
Média*	14,27904	0,284151	50,2517	0,000396
pH (L)	0,49969	0,174268	2,8674	0,103150
pH (Q)*	-2,88905	0,207947	-13,8932	0,005141
Temperatura (L)*	0,93383	0,174268	5,3586	0,033106
Temperatura (Q)*	-1,41901	0,207947	-6,8239	0,020807
pH (L) x T (L)*	1,19968	0,246085	4,8751	0,039594

*Fatores estatisticamente significativos (p<0,05).

Tabela 8 – Análise de variância – ANOVA, para atividade enzimática de β – galactosidase livre de *K. lactis* (U/mL).

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F_{cal}
Regressão	799242,87	5	159848,57	14,28
Resíduo	55955,56	5	11191,11	
Falta de ajuste	55832,0	3		
Erro Puro	123,6	2		
Total	743287,3	10		

R= 0,92; F_{tab.0,95; 5;5}= 5,05.

Tabela 9 – Análise de variância – ANOVA, para atividade enzimática de β – galactosidase livre de *A. oryzae* (U/mg).

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F_{cal}
Regressão	67,52	4	16,88	33,70
Resíduo	3,00	6	0,50	
Falta de ajuste	2,52	4		
Erro Puro	0,48	2		
Total	64,51	10		

R= 0,95; F_{tab.0,95; 4;6}= 4,53.

Tabela 16 – Coeficiente de regressão, erro padrão, valores de p e t do planejamento fatorial completo DCCR 2² para atividade enzimática de β – galactosidase imobilizada de *K. lactis* (U/g) em suporte de AGPCa.

	Coeficientes de regressão	Erro puro	t(5)	p
Média*	0.429985	0.010109	42.5337	0.000552
CaCl ₂ (L)	-0.012933	0.006200	-2.0860	0.172290
CaCl ₂ (Q)*	-0.125747	0.007398	-16.9970	0.003444
Alginato de sódio (L)*	-0.132516	0.006200	-21.3738	0.002182
Alginato de sódio (Q)*	-0.086797	0.007398	-11.7323	0.007187
CaCl ₂ (L) x Alginato de sódio (L)	-0.000335	0.008755	-0.0383	0.972953

*Fatores estatisticamente significativos (p<0,05).

Tabela 17 – Análise de variância – ANOVA, para atividade enzimática de β – galactosidase imobilizada de *K. lactis* (U/g), em suporte de AGPCa.

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F_{cal}
Regressão	0,30	3	0,10	25,93
Resíduo	0,03	7	0,00	
Falta de ajuste	0,026168	5		
Erro Puro	0,000613	2		
Total	0,270826	10		

R= 0,90; F_{tab.0,95; 3;7}= 4,35.

Tabela 28 – Coeficiente de regressão, erro padrão, valores de p e t do planejamento fatorial completo DCCR 2² para atividade enzimática de β – galactosidase imobilizada de *A. oryzae* (U/g), em suporte de PU.

	Coeficientes de regressão	Erro puro	t(5)	p
Média *	11.82840	0.381935	30.96966	0.001041
pH (L) *	1.32400	0.234238	5.65238	0.029903
pH (Q) *	-2.57103	0.279507	-9.19846	0.011613
Temperatura (L)	0.56148	0.234238	2.39706	0.138722
Temperatura (Q) *	-1.65559	0.279507	-5.92324	0.027339
pH (L) x T (L)	0.05750	0.330769	0.17384	0.877997

*Fatores estatisticamente significativos ($p < 0,05$).

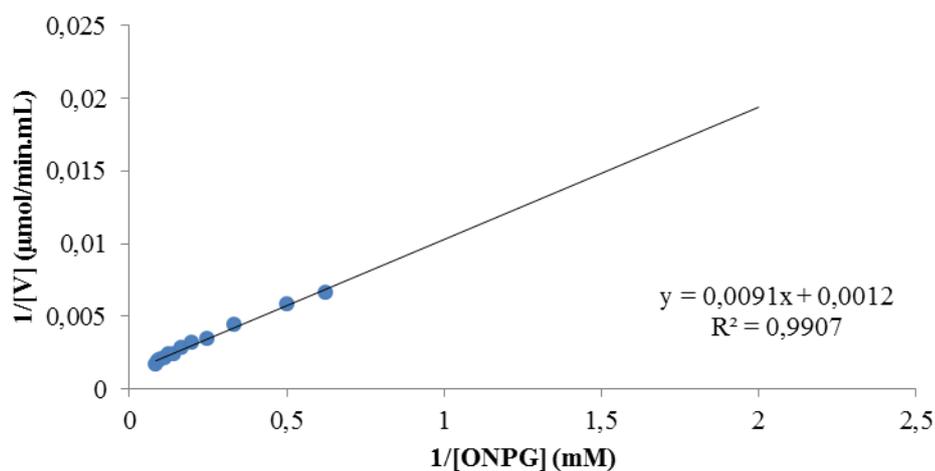
Tabela 29 – Análise de variância – ANOVA, para atividade enzimática de β – galactosidase imobilizada de *A. oryzae* (U/g), em suporte de PU.

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F_{cal}
Regressão	72,59	5	14,52	10,35
Resíduo	7,01	5	1,40	
Falta de ajuste	6,13509	3		
Erro Puro	0,87527	2		
Total	65,57905	10		

R= 0,90; F_{tab.0,95; 5;5}= 5,05.

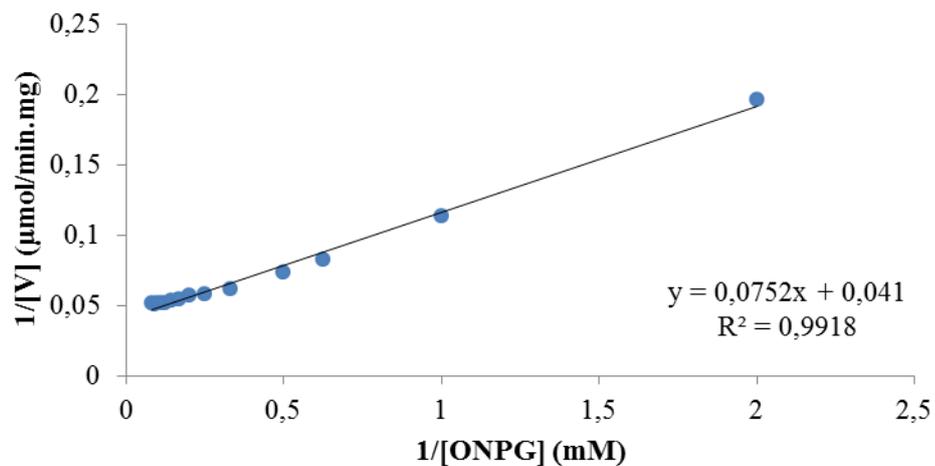
APÊNDICE B

Figura 16 – Linearização utilizando o modelo de Lineweaver-Burk dos dados de atividade de β – galactosidase comercial livre (U/mL), oriunda de *K. lactis*, em relação à concentração do substrato ONPG (mM).



Fonte: O autor (2015).

Figura 17 – Linearização utilizando o modelo de Lineweaver-Burk dos dados de atividade de β – galactosidase comercial livre (U/mg), oriunda de *A. oryzae*, em relação à concentração do substrato ONPG (mM).



Fonte: O autor (2015).