



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

CARLOS ALBERTO CHAVES GIRÃO NETO

**BIOCATALISADORES SINTETIZADOS A PARTIR DE β -GALACTOSIDASE
DE *Kluyveromyces lactis* IMOBILIZADA EM SUPORTES REVESTIDOS COM
POLIETILENIMINA (PEI) E SUA APLICAÇÃO NA SÍNTESE DE
PREBIÓTICOS**

FORTALEZA

2020

CARLOS ALBERTO CHAVES GIRÃO NETO

BIOCATALISADORES SINTETIZADOS A PARTIR DE β -GALACTOSIDASE DE
Kluyveromyces lactis IMOBILIZADA EM SUPORTES REVESTIDOS COM
POLIETILENIMINA (PEI) E SUA APLICAÇÃO NA SÍNTESE DE PREBIÓTICOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia Química. Área de concentração: Processos Químicos e Bioquímicos.

Orientadora: Prof^a. Dra. Maria Valdez Ponte Rocha.

Co-orientadora: Prof^a. Dra. Luciana Rocha Barros Gonçalves.

FORTALEZA

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

G432b Girão Neto, Carlos Alberto Chaves.

Biocatalisadores sintetizados a partir de α -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* immobilizada em suportes revestidos com polietilenimina (PEI) e sua aplicação na síntese de prebióticos / Carlos Alberto Chaves Girão Neto. – 2020.

65 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Fortaleza, 2020.

Orientação: Profa. Dra. Maria Valderez Ponte Rocha.

Coorientação: Profa. Dra. Luciana Rocha Barros Gonçalves.

1. α -galactosidase. 2. Imobilização. 3. Polietilenimina (PEI). 4. Lactulose. 5. Soro de leite. I. Título.

CDD 660

CARLOS ALBERTO CHAVES GIRÃO NETO

BIOCATALISADORES SINTETIZADOS A PARTIR DE β -GALACTOSIDASE DE
Kluyveromyces lactis IMOBILIZADA EM SUPORTES REVESTIDOS COM
POLIETILENIMINA (PEI) E SUA APLICAÇÃO NA SÍNTESE DE PREBIÓTICOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia Química. Área de concentração: Processos Químicos e Bioquímicos.

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dra. Maria Valderez Ponte Rocha (Orientadora)

Universidade Federal do Ceará (DEQ/UFC)

Prof. Dr. Roberto Fernández-Lafuente

Instituto de Catálisis y Petroleoquímica – ICP (Madri-Espanha)

Dr. Tiago Lima de Albuquerque

Universidade Federal do Ceará (DEQ/UFC)

A Deus, por ter me abençoado com mais essa oportunidade. Aos meus anjos da guarda, meus avós Irenice e Carlos, por todo o amor e suor derramado para que eu pudesse realizar os meus sonhos. A minha família, em especial a minha mãe, irmã, padrasto e tia, também por todo o amor e suporte incondicional. E aos meus amigos, por sempre estarem comigo quando mais precisei. Eu amo todos vocês.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer a Deus, por ter me abençoado com a oportunidade de realizar mais um sonho, e por me mostrar todos os dias que o Seu amor e misericórdia são maiores do que tudo nesse mundo.

Aos meus avós, Irenice e Carlos, que apesar de todas as dificuldades que enfrentaram para que eu e minha irmã pudéssemos realizar os nossos sonhos, nunca deixaram nos faltar nada nessa vida, especialmente o amor.

A minha família, em especial a minha mãe, irmã, padrasto e tia, pelo suporte incondicional, por sempre me apoiarem e me amarem do jeitinho que eu sou.

A minha segunda família, Lúcia, Luciano, Ediléa e Aguirre, por todo o amor, incentivo e por sempre me receberem de braços abertos.

Aos meus amigos, em especial a Bruna, Artur, Andrêssa, Airlane, Bianca, Rhony, Suelen, Hiago, Rayane, Klausney, Mary e Tailton, por estarem comigo quando mais precisei e por me mostrarem todos os dias o verdadeiro significado da palavra amizade.

As minhas orientadoras, professoras Valderez e Luciana, por todos os ensinamentos compartilhados no decorrer desses dois anos, e pela dedicação e suporte dados aos seus alunos.

A minha família GPBio, em especial a Juliana, Layanne, Carlinha, Paulinha, Eddie, Ravena e Tici, por tornarem essa jornada mais leve e divertida, e por toda a ajuda e noites de afinco para que pudéssemos cumprir nossas atividades.

Ao CNPq, pelo consentimento da bolsa de pesquisa.

“Não é sobre ganhar, é sobre não desistir. Se você tem um sonho, lute por ele. Existe uma disciplina. Não é sobre quantas vezes você foi rejeitado, caiu e teve que levantar. É quantas vezes você fica em pé, levanta a cabeça e segue em frente” (Lady Gaga, 2019)

RESUMO

A intolerância à lactose é uma condição que afeta milhares de pessoas atualmente, e o aumento na incidência de casos de intolerância tem despertado o interesse das indústrias de alimentos em desenvolverem produtos *free lactose*. Com isso, o uso de enzimas imobilizadas para a obtenção desses produtos apresenta-se como uma alternativa atrativa do ponto de vista industrial, principalmente devido à possibilidade de reutilização desses biocatalisadores. Dentre as enzimas capazes de catalisar essas reações, podemos citar as β -galactosidases. Além de hidrolisar a lactose, essas enzimas são responsáveis também por produzir açúcares com função prebiótica, como por exemplo a lactulose, um prebiótico amplamente utilizado para o tratamento de constipação crônica e encefalopatia hepática. A produção enzimática de prebióticos, quando comparada à produção química atualmente utilizada pelas indústrias, apresenta certas vantagens, como alta especificidade e seletividade das enzimas ao substrato, além destas serem biodegradáveis, o que torna esse processo mais quimicamente verde. Em adição, as reações catalisadas por enzimas são geralmente conduzidas em condições brandas, minimizando assim a degradação do produto e reduzindo o gasto energético do processo. Estratégias de imobilização utilizando suportes revestidos com polímeros multifuncionais apresentam certas vantagens, tais como promoção de maior estabilização enzimática, principalmente de enzimas multiméricas, como as β -galactosidases, além de prolongar a vida útil dos biocatalisadores e protegê-los contra variações ambientais. Além disso, o uso dessas estratégias pode melhorar substancialmente os parâmetros de imobilização e, conseqüentemente, a eficiência dos processos enzimáticos. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a utilização de suportes de quitosana-glutaraldeído e glioxil-agarose não revestidos e revestidos com polietilenimina (PEI) para imobilização de β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* e aplicar os biocatalisadores obtidos na hidrólise da lactose e síntese de prebióticos, utilizando o soro de leite como matéria-prima. Os suportes de agarose revestidos com PEI apresentaram um melhor desempenho para imobilizar a β -galactosidase. Além disso, esses biocatalisadores foram eficientes na hidrólise da lactose e na produção de prebióticos, alcançando mais de 90% de conversão de lactose e produção máxima de lactulose de $7,02 \pm 0,02$ g/L e $11,31 \pm 1,60$ g/L para os biocatalisadores Qui_Glu_PEI_Gal e Aga_Gli_PEI_Gal, respectivamente. Entretanto, os biocatalisadores obtidos com os suportes revestidos com PEI apresentaram menor estabilidade térmica a 50 °C e baixa estabilidade operacional, fato explicado pela interação entre a enzima e o suporte ser do tipo adsorção. A síntese de lactulose usando o soro de leite como matéria-prima mostrou-se eficaz, atingindo uma produção máxima de $7,60 \pm 0,4$ g/L para o biocatalisador Qui_Glu_PEI_Gal e $13,90 \pm 0,96$ g/L para o biocatalisador Aga_Gli_PEI_Gal, apresentando-se como uma alternativa industrialmente promissora para a produção de prebióticos e ecologicamente sustentável por reduzir o impacto ambiental causado pelo descarte direto desse resíduo no meio ambiente.

Palavras-chave: β -galactosidase. Imobilização. Polietilenimina (PEI). Lactulose. Soro de leite.

ABSTRACT

Lactose intolerance affects thousands of people nowadays, and the increase in the incidence of cases of intolerance has awakened the interest of the food industries to develop free lactose products. Thus, the use of immobilized enzymes to obtain these products is an attractive alternative from an industrial point of view, mainly due to the possibility of their reuse. β -galactosidases are able to catalyze these reactions. In addition to hydrolyzing lactose, these enzymes are also responsible for producing sugars with prebiotic function, such as lactulose, a prebiotic widely used for the treatment of chronic constipation and hepatic encephalopathy. Enzymatic prebiotics production, when compared to chemical production currently used by industries, has certain advantages such as high specificity and selectivity of enzymes to the substrate, besides being biodegradable, which makes this process greener. Besides, enzyme-catalyzed reactions are generally conducted under mild conditions, thus minimizing product degradation and reducing process energy expenditure. Immobilization strategies using multi-functional polymer coated supports have certain advantages, such as promoting greater enzymatic stabilization, especially of multimeric enzymes, such as β -galactosidases, as well as extending the life of biocatalysts and protecting them against environmental variations. Moreover, these strategies can substantially improve the immobilization parameters and, consequently, the efficiency of enzymatic processes. Therefore, the aim of this work was to evaluate the use of chitosan-glutaraldehyde and glyoxyl-agarose supports uncoated and coated with polyethylenimine (PEI) to immobilize β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* and apply the obtained biocatalysts in the hydrolysis of lactose and synthesis of prebiotics, using whey as feedstock. PEI-coated agarose supports performed better to immobilize β -galactosidase. Besides that, these biocatalysts were efficient in the hydrolysis of lactose and prebiotic production, achieving over 90% lactose conversion and maximum lactulose production of $7.02 \pm 0,02$ g/L and 11.31 ± 1.60 g/L for the Qui_Glu_PEI_Gal and Aga_Gli_PEI_Gal biocatalysts, respectively. However, biocatalysts obtained using PEI-coated supports showed lower thermal stability at 50 °C and low operational stability, a fact explained by the interaction between the enzyme and the support being of the adsorption type. The lactulose synthesis using whey as feedstock was very effective, reaching a maximum lactulose production of 7.60 ± 0.4 g/L for the biocatalyst Qui_Glu_PEI_Gal and 13.90 ± 0.96 g/L for the Aga_Gli_PEI_Gal biocatalyst, proving to be an industrially promising alternative for the production of prebiotics and ecologically sustainable because it reduces the environmental impact caused by the direct disposal of this waste in the environment.

Keywords: β -galactosidase. Immobilization. Polyethylenimine (PEI). Lactulose. Whey.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Reações de hidrólise de lactose e síntese de lactulose catalisadas pelas β -galactosidasas	24
Figura 2	– Aspecto visual dos suportes de: quitosana ativada com glutaraldeído (A) quitosana ativada com glutaraldeído e revestida com PEI (B); agarose ativada com glicidol (C); agarose ativada com glicidol e revestida com PEI (D)	32
Figura 3	– Curso de imobilização da β -galactosidase de <i>Kluyveromyces lactis</i> a pH 7,0 e 25 °C em tampão fosfato de potássio 100 mM contendo MnCl ₂ 0,2 mM, sob agitação suave durante 6 h. β -galactosidase imobilizada em: quitosana ativada com glutaraldeído (A); quitosana ativada com glutaraldeído e revestida com PEI (B); (C) agarose ativada com glicidol; (D) agarose ativada com glicidol e revestida com PEI. (■) controle (branco); (●) sobrenadante	38
Figura 4	– Estrutura da β -galactosidase de <i>Kluyveromyces lactis</i> destacando-se os resíduos de aminoácidos (lisina (verde); arginina (azul escuro); histidina (azul claro); triptofano (rosa); asparginato (amarelo); glutamato (laranja)) e os resíduos que participam do sítio ativo ((GLU 482 e GLU 551) em vermelho e formato de esfera (PDB code: 30B8)). (A) Resíduos que reagem com o glutaraldeído; (B) Resíduos que reagem com o glicidol; (C) Resíduos que reagem com o PEI	40
Figura 5	– Imobilização da β -galactosidase de <i>Kluyveromyces lactis</i> em: quitosana ativada com glutaraldeído (A) e quitosana ativada com glutaraldeído e revestida com PEI (B)	42
Figura 6	– Espectros de FTIR dos suportes e biocatalisadores de (A) quitosana e (B) agarose	43
Figura 7	– Imobilização da β -galactosidase de <i>Kluyveromyces lactis</i> em: agarose ativada com glicidol (A) e agarose ativada com glicidol e revestida com PEI (B)	45
Figura 8	– Estabilidade térmica dos diferentes biocatalisadores de β -galactosidase de <i>Kluyveromyces lactis</i> a 50 °C, pH 6,6 em tampão fosfato de potássio 50 mM,	

contendo 0,1 mM de MnCl₂. (■) Qui_Glu; (■) Qui_Glu_PEI; (●) Aga_Gli; (●) Aga_Gli_PEI. As curvas representam o modelo de Sadana e Henley 46

Figura 9 – Hidrólise de lactose e produção de lactulose pela enzima β-galactosidase de *Kluyveromyces lactis* imobilizada em: (A) quitosana ativada com glutaraldeído; (B) quitosana ativada com glutaraldeído e revestida com PEI; (C) agarose ativada com glicidol; (D) agarose ativada com glicidol e revestida com PEI. Condições reacionais: razão de massa de 1:2 lactose/ frutose, concentração total de substrato de 200 g/L, 50 °C, pH 7, 4 U/mL e 120 rpm. (●) concentrações de lactose e (●) lactulose 48

Figura 10 – Hidrólise de lactose e produção de lactulose usando soro de leite como substrato para: (A) biocatalisador Qui_Glu_Gal; (B) biocatalisador Qui_Glu_PEI_Gal; (C) biocatalisador Aga_Gli_PEI_Gal. Condições reacionais: razão de massa de 1:2 lactose/frutose, concentração total de substrato de 200 g/L, 50 °C, pH 7, 4 U/mL e 120 rpm. (●) concentrações de lactose e (●) lactulose 52

Figura 11 – Concentrações de lactulose obtidas durante o estudo da estabilidade operacional dos derivados enzimáticos em catálise de solução sintética de lactose (A) e soro de leite (B). Condições reacionais: razão de massa de 1:2 lactose/frutose, concentração total de substrato de 200 g/L, 50 °C, pH 7, 4 U/mL e 120 rpm. Barras pretas: biocatalisador Qui_Glu_Gal; Barras vermelhas: biocatalisador Qui_Glu_PEI_Gal; Barras azuis: biocatalisador Aga_Gli_PEI_Gal 55

Figura 12 – Conversões de lactose obtidas durante o estudo da estabilidade operacional dos biocatalisadores em catálise de solução sintética de lactose (A) e soro de leite (B). Condições reacionais: razão de massa de 1:2 lactose/frutose, concentração total de substrato de 200 g/L, 50 °C, pH 7, 4 U/mL e 120 rpm. Barras pretas: biocatalisador Qui_Glu_Gal; Barras vermelhas: biocatalisador Qui_Glu_PEI_Gal; Barras azuis: biocatalisador Aga_Gli_PEI_Gal 55

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 – Parâmetros de imobilização obtidos no processo realizado a pH 7,0 e 25 °C em tampão fosfato de potássio 100 mM contendo MnCl₂ 0,1 mM e MgCl₂ 0,2 mM, sob agitação suave por 2h. β-galactosidase imobilizada em: quitosana ativada com glutaraldeído (Qui_Glu); quitosana ativada com glutaraldeído e revestida com PEI (Qui_Glu_PEI); agarose ativada com glicidol (Aga_Gli); agarose ativada com glicidol e revestida com PEI (Aga_Gli_PEI). Letras diferentes representam diferenças estatísticas em um nível de confiança de 95% (p < 0,05) 39
- Tabela 2 – Parâmetros de desativação e meia-vida dos biocatalisadores a pH 6,6 e 50 °C obtidos usando o modelo de Sadana e Henley. Letras diferentes representam diferenças estatísticas em um nível de confiança de 95% (p < 0,05) 47
- Tabela 3 – Desempenho dos biocatalisadores de *Kluyveromyces lactis* na hidrólise da lactose e produção de lactulose usando lactose PA como substrato. Condições reacionais: razão de massa de 1:2 lactose/frutose, concentração total de substrato de 200 g/L, 50 °C, pH 7 e 4 U/mL. Letras diferentes representam diferenças estatísticas em um nível de confiança de 95% (p < 0,05) 49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

GOS	Galactooligossacarídeos
PEI	Polietilenimina
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
DNTs	Doenças não transmissíveis
OMS	Organização Mundial de Saúde
ACIPP	Associação Científica Internacional para Probióticos e Prebióticos
FOS	Frutooligossacarídeos
IMO	Isomaltooligossacarídeos
XOS	Xilooligossacarídeos
AXOS	Arabinoxilano–oligossacarídeos
ONPG	<i>o</i> -nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo
V_t	Volume total (mL)
ϵ	Coefficiente de extinção (L/mol.cm ⁻¹)
L	Caminho óptico (cm)
V_e	Volume de enzima (mL)
m_d	Massa de derivado (g)
Qui_Glu	Suporte de quitosana ativada com glutaraldeído
Qui_Glu_PEI	Suporte de quitosana ativada com glutaraldeído e revestido com PEI
Aga_Gli	Suporte de agarose ativada com glicidol
Aga_Gli_PEI	Suporte de agarose ativada com glicidol e revestido com PEI
E	Eficiência (%)
R	Rendimento de imobilização (%)
A_{oferecida}	Atividade oferecida (U/g)
A_{biocatalisador}	Atividade do biocatalisador (U/g)
X_{LA}	Porcentagem de hidrólise de lactose
[LA]₀	Concentração inicial de lactose (g/L)
[LA]_f	Concentração final de lactose (g/L)
Y_{LU}	Rendimento de lactulose (%)
m_{LU}	Massa de lactulose produzida no processo (g)
m_{LA}	Massa inicial de lactose (g)
Q	Produtividade (mg/(L.h))

[LU]_{max}	Concentração máxima de lactulose (g/L)
t_{[LU]max}	Tempo necessário para obtê-los (h)
ASB	Albumina de Soro Bovino
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
ANOVA	Análise de variância
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
LuGOS	Oligossacarídeos à base de lactulose
FTIR	Infravermelho com Transformada de Fourier

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	OBJETIVOS	18
2.1	Objetivo geral	18
2.2	Objetivos específicos	18
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
3.1	Produtos <i>free lactose</i>	19
3.2	Prebióticos	20
3.3	Lactulose	21
3.4	Produção de lactulose por via enzimática	23
3.5	Imobilização de enzimas	24
3.6	Revestimento de suportes com polietilenimina (PEI)	26
4	MATERIAIS E MÉTODOS	29
4.1	Material	29
4.1.1	<i>Reagentes</i>	29
4.1.2	<i>Enzima utilizada</i>	29
4.2	Métodos	29
4.2.1	<i>Determinação da atividade da enzima β-galactosidase pela hidrólise do substrato ONPG</i>	29
4.2.2	<i>Preparação dos suportes</i>	30
4.2.2.1	<i>Quitosana ativada com glutaraldeído (Qui_Glu)</i>	30
4.2.2.2	<i>Quitosana ativada com glutaraldeído e revestida com polietilenimina (PEI) (Qui_Glu_PEI)</i>	31
4.2.2.3	<i>Agarose ativada com glicidol (Aga_Gli)</i>	31
4.2.2.4	<i>Agarose ativada com glicidol e revestida com PEI (Aga_Gli_PEI)</i>	31
4.2.3	<i>Caracterização dos suportes e biocatalisadores obtidos</i>	32
4.2.3.1	<i>Análise por Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)</i>	32
4.2.4	<i>Avaliação da imobilização da enzima β-galactosidase</i>	33
4.2.5	<i>Determinação dos parâmetros de imobilização</i>	33
4.2.6	<i>Estabilidade térmica dos biocatalisadores</i>	34

4.2.7	<i>Eficiência catalítica dos biocatalisadores na hidrólise da lactose e produção de lactulose</i>	34
4.2.8	<i>Avaliação da produção de lactulose usando soro de leite</i>	35
4.2.9	<i>Estabilidade operacional</i>	35
4.2.10	<i>Métodos analíticos</i>	36
4.2.11	<i>Análise estatística</i>	36
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
5.1	Avaliação da imobilização da enzima β-galactosidase e estabilidade térmica dos biocatalisadores	37
5.2	Eficiência catalítica dos biocatalisadores na hidrólise de lactose e produção de lactulose	47
5.3	Avaliação da produção enzimática de lactulose utilizando soro de leite como matéria-prima e estabilidade operacional dos biocatalisadores	50
6	CONCLUSÃO	56
	REFERÊNCIAS	57

1 INTRODUÇÃO

A lactulose é um dissacarídeo sintético composto por moléculas de frutose e galactose e com estrutura química 4-O- β -D-galactopiranosil-D-frutofuranose. Pertence ao grupo de galactooligosacarídeos (GOS), que são açúcares com função prebiótica. Possui propriedades terapêuticas e promotoras de saúde, pois estimula o crescimento de microrganismos cuja ação é benéfica para o corpo e também atua no tratamento da constipação crônica e da encefalopatia hepática (PANESAR; KUMARI, 2011; SILVÉRIO et al., 2016). Geralmente é produzida por isomerização da lactose por catálise química (MONTILLA et al., 2005; AIDER; HALLEUX, 2007) ou síntese enzimática (PADILLA et al., 2015; ALBUQUERQUE et al., 2018; NGUYEN et al., 2018), sendo este último processo mais atrativo porque é considerado uma tecnologia verde devido ao caráter biodegradável das enzimas e a essas catalisarem suas reações em condições brandas, reduzindo assim o gasto energético do processo (NOOSHKAM et al., 2018).

A via biocatalítica mais amplamente utilizada para a síntese de lactulose é a transgalactosilação de galactose com frutose catalisada por β -galactosidasas (E.C. 3.2.1.23). Essas enzimas também atuam catalisando a hidrólise da lactose, sendo um processo amplamente utilizado nas indústrias de laticínios para a obtenção de produtos lácteos livres de lactose.

Sabe-se que o principal subproduto proveniente dessas indústrias durante a produção de queijos é o soro de leite, porém o seu descarte sem prévio tratamento é prejudicial ao meio ambiente, principalmente devido à presença de lactose residual. Portanto, uma alternativa promissora para solucionar esse problema seria o uso desse resíduo industrial como matéria-prima para a produção biotecnológica de prebióticos como a lactulose (BUDRIENE et al., 2005; SONG et al., 2013a, 2013b; ALBUQUERQUE et al., 2018). Existe um interesse crescente no uso de prebióticos como ingredientes funcionais em alimentos, pois eles regulam a composição da microbiota intestinal para restaurá-la ou mantê-la e, assim, promover benefícios à saúde humana (LI et al., 2016; DÁVILA et al., 2019).

O uso de enzimas como biocatalisadores em bioprocessos é amplamente estudado e aplicado, estando esse uso aliado a certas características enzimáticas que são consideradas atrativas, tais como sua alta seletividade e especificidade ao substrato, a necessidade de condições moderadas de temperatura e pressão, bem como sua boa eficácia e baixa carga ambiental, são alguns dos principais fatores que tornam esses

biocatalisadores promissores (SATYAWALI et al., 2017), e a imobilização enzimática aparece como uma alternativa para a otimização dessas características (BÖTTCHER; BORNSCHEUER, 2010; LÜTZ, 2013; SATYAWALI et al., 2017). Esses processos podem melhorar certas propriedades enzimáticas, tais como i) a estabilidade e a atividade enzimática; ii) especificidade ou seletividade das enzimas; e iii) sua pureza, (VIRGEN-ORTÍZ et al., 2017). Do ponto de vista industrial, a principal vantagem do uso de enzimas imobilizadas é a possibilidade de sua reutilização (SHELDON e VAN PELT, 2013).

Estratégias de imobilização podem ser utilizadas com êxito para imobilizar as β -galactosidases, como por exemplo, o uso de ligações covalentes (BORNSCHEUER, 2003; GRAZU et al., 2006; MATEO et al., 2006; ZAAK et al., 2017) e métodos de adsorção (YU et al., 2007; ADLERCREUTZ, 2013; MARTINS et al., 2013; KLEIN et al., 2016; ZAMZURI et al., 2017). Uma técnica de imobilização conduzida corretamente pode gerar um biocatalisador que mantenha boa eficiência durante todo o tempo de reutilização e armazenamento (BORNSCHEUER, 2003; DICOSIMO et al., 2013). A imobilização de β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* e *Aspergillus niger* por ligação covalente, por exemplo, foi relatada por Padilla et al. (2015), Albuquerque et al. (2018) e Nguyen et al. (2018). Em todos esses estudos foi apontada perda de atividade no processo de imobilização e principalmente durante a reutilização dos biocatalisadores obtidos, pois se trata de uma enzima multimérica que pode facilmente perder suas subunidades e, conseqüentemente, sofrer desativação.

Por esse motivo, o revestimento de suportes é uma alternativa promissora para prolongar sua vida útil, por exemplo, o revestimento com polietilenimina (PEI). Essa substância é um polímero multifuncional que envolve a enzima quando imobilizada e se adequa à sua estrutura, proporcionando maior estabilidade, especialmente para enzimas multiméricas como as β -galactosidases, e também a protege de variações ambientais (como temperatura e pH), bem como dos efeitos agressivos do agente ativador, quando este é utilizado. Além disso, pode melhorar substancialmente a atividade do biocatalisador, eficiência e rendimento de imobilização (VIRGEN-ORTÍZ et al., 2017). A estratégia de imobilizar β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* em suportes de quitosana e agarose revestidos com PEI para a produção de prebióticos como a lactulose, usando o soro de leite como matéria-prima, até o presente momento não foi relatada na literatura. Neste contexto, o presente estudo tem como objetivo avaliar a utilização de suportes de quitosana-glutaraldeído e glioxil-agarose não revestidos e revestidos com polietilenimina (PEI) para imobilização de β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* e

aplicar os biocatalisadores sintetizados na obtenção de produtos com baixo teor de lactose e na produção de prebióticos usando o soro de leite como matéria-prima.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Desenvolver biocatalisadores de β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* a partir de suportes de quitosana e agarose revestidos com polietilenimina (PEI) e aplicá-los na obtenção de produtos com baixo teor de lactose e na produção de prebióticos usando soro de leite como matéria-prima.

2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar os suportes e biocatalisadores obtidos por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR);
- Determinar a estabilidade térmica dos biocatalisadores obtidos;
- Analisar a eficiência catalítica dos biocatalisadores na hidrólise de lactose e produção de lactulose usando lactose PA como substrato;
- Analisar a eficiência catalítica dos biocatalisadores na hidrólise de lactose e produção de lactulose usando soro de leite como matéria-prima;
- Avaliar a estabilidade operacional dos biocatalisadores obtidos na hidrólise de lactose e produção de lactulose.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Produtos *free lactose*

Cerca de 75% da população mundial adulta é intolerante à lactose (SURI et al., 2019), variando essa estatística de acordo com o grupo populacional (MESSIA; CANDIGLIOTA; MARCONI, 2007). Essa condição está presente em até 15% das pessoas no norte da Europa, até 80% dos negros e latinos (SUEBSIRI et al., 2019) e entre 65 e 85% dos adultos no leste asiático e africano (HEANEY, 2013). Essa intolerância é caracterizada por uma diminuição geneticamente programada da enzima lactase intestinal, impossibilitando assim a digestão ou absorção da lactose pelo organismo humano. Essa alteração ou redução da expressão do gene da lactase provoca o que é conhecido por “deficiência primária de lactase”, enquanto danos no epitélio do intestino delgado, devido a diferentes doenças intestinais, geram a “deficiência secundária de lactase”, sendo essa última condição comumente reversível com a correção da doença subjacente (LUCIA MONTI, 2017). Os sintomas geralmente incluem dor e inchaço abdominal, flatulência excessiva e fezes aquosas quando ingeridos alimentos que contêm lactose. O tratamento normalmente consiste em se evitar alimentos que contenham lactose, além da ingestão da enzima lactase (HEANEY, 2013).

Sabe-se que o leite e os produtos lácteos derivados são alimentos ricos em nutrientes, especialmente o cálcio. Logo, dietas rigorosas e que restringem o consumo de lactose geralmente causam deficiências nutricionais que podem ocasionar em certos problemas de saúde no paciente, tais como disfunção imunológica, problemas no cólon, dentre outros (WAHLQVIST, 2015; LUCIA MONTI, 2017; SURI et al., 2019). O aumento na incidência de casos de intolerância tem despertado o interesse das indústrias de alimentos à desenvolverem produtos *free lactose*. No entanto, a obtenção desse tipo de produto é processo complexo para os fabricantes, cujo principal desafio é o a busca por alternativas para produzir produtos livres de lactose que sejam bem aceitas pelos consumidores que são intolerantes, bem como a segurança do produto, sua aceitabilidade e acessibilidade estarem alinhados com as diretrizes aprovadas pela FDA (*Food and Drug Administration*) (SURI et al., 2019). Desafios como esses têm impulsionado o surgimento de pesquisas que buscam desenvolver novas tecnologias para obtenção de produtos isentos de lactose que atendam não somente aos consumidores mas sigam as regras

emitidas pelas agências governamentais, além de aumentar o entusiasmo dos consumidores pela compra de alimentos funcionais.

3.2 Prebióticos

Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), cerca de 72% de todas as mortes no mundo são ocasionadas por obesidade e doenças não transmissíveis (DNTs) (OLIVETO, 2018). O aumento dos casos de diabetes e de obesidade na América Latina afeta principalmente crianças, ocasionando uma maior probabilidade de morte prematura e incapacidade na vida adulta (OMS, 2018). Já no Brasil, segundo dados fornecidos pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em 2016, observa-se que houve um aumento na incidência de obesidade nos últimos anos. Segundo a mesma organização, cerca de 39% dos adultos estão acima do peso, sendo 13% deles obesos, e mais de 41 milhões de crianças menores de cinco anos também estão acima do peso. Pelo menos 2,8 milhões de pessoas morrem anualmente devido a problemas decorrentes de obesidade e excesso de peso (OMS, 2010; OMS, 2018). Isso tem motivado uma mudança na cultura alimentar em todo o mundo, e a modernização tem levado a transições nos hábitos alimentares, destacando-se a busca por alimentos mais saudáveis (como os alimentos funcionais) e de calorias controladas (MOHANTY et al., 2018).

Os alimentos funcionais estão recebendo maior reconhecimento devido ao surgimento de tecnologias aprimoradas para avaliar e quantificar suas aplicações terapêuticas e práticas. E dentro desse grupo de alimentos, os prebióticos têm se destacado e sua ingestão têm sido cada vez mais recomendada pelas agências governamentais de saúde pública com a finalidade de manter e melhorar a saúde e o bem-estar da população (SLAVIN, 2013). Segundo a Associação Científica Internacional para Probióticos e Prebióticos (ACIPP), um prebiótico é definido como “um substrato que é utilizado seletivamente pelos microrganismos hospedeiros, conferindo um benefício à saúde”. Essa definição expande o conceito de prebióticos por incluir substâncias que não sejam carboidratos, e que possuem aplicações em locais do corpo que não sejam somente o trato gastrointestinal, tais como pele, cabelo, etc., além de englobar outras categorias além de alimentos (MOHANTY et al., 2018). Os prebióticos conferem diversos benefícios à saúde, e dentre eles podemos citar: proteção contra aterosclerose e doenças cardiovasculares, propriedades antioxidantes, atividade antitumoral, etc. (HUEBNER; WEHLING; HUTKINS, 2007; KACZMARCZYK; MILLER; FREUND, 2012;

GUINANE; COTTER, 2013). Além disso, certos prebióticos, com destaque para os frutooligosacarídeos, são capazes de melhorar determinadas características de qualidade dos alimentos, tais como propriedades sensoriais (sensação na boca/palatabilidade), e podem ser usados também como agentes adoçantes (PADMA ISHWARYA; PRABHASANKAR, 2013).

Carboidratos não digeríveis, como polissacarídeos (amido resistente, dextrina e pectina) e oligossacarídeos, como frutooligosacarídeos (FOS), galactooligosacarídeos (GOS), isomaltoligosacarídeos (IMO), xilooligosacarídeos (XOS), além dos arabinosilano-oligosacarídeos (AXOS), inulina, dentre outros, são considerados alimentos com propriedades prebióticas (MANO et al., 2017; COLANTONIO; MOHANTY; MISRA; MOHAPATRA; SAHU, 2019). Os GOS não são digeríveis e são derivados da reação de transglicosilação da lactose catalisada por β -galactosidases, resultando na produção de uma molécula de lactose com um ou mais resíduos de galactosil ligados por β 1-3, β 1-4 e β 1-6. Dentre os exemplos GOS, podemos citar a lactulose, um carboidrato formado por monômeros de frutose e galactose ligados por uma ponte β -glicosídica do tipo β 1-4 (SAKO; MATSUMOTO; TANAKA, 1999; GIBSON, 2008; SANTOS et al., 2009).

3.3 Lactulose

Lactulose é um dissacarídeo com a estrutura química de 4-O- β -D-galactopiranosil-D-frutose, conhecido como um material sintético não digerível de lactose (AÏT-AISSA; AÏDER, 2014), formado por monômeros de frutose e galactose ligados por uma ponte β -glicosídica (SCHUMANN, 2002). Essa ligação β 1-4 entre os dois açúcares permite que existam cinco formas anoméricas de lactulose (KIM; PARK; OH, 2006; AIDER; HALLEUX, 2007). Assim como a lactose, tem fórmula empírica de $C_{12}H_{22}O_{11}$. Além disso, possui peso molecular de $342,30 \text{ g.mol}^{-1}$ (NOOSHKAM; BABAZADEH; JOOYANDEH, 2018) e apresenta maior doçura em relação à lactose (50%) e à sacarose (60%) (SCHUMANN, 2002; PANESAR; KUMARI, 2011).

A lactulose é higroscópica, insolúvel em éter (SCHUMANN, 2002), mas a sua solubilidade em etanol, isopropanol, metanol e propanol é 15 vezes maior do que a da lactose, a uma temperatura de $30 \text{ }^\circ\text{C}$, o que possibilita a sua recuperação de soluções alcoólicas ao final da sua síntese (MONTAÑÉS, OLANO, & IBÁÑEZ, 2007). Outra

característica positiva, do ponto de vista industrial, é a sua alta estabilidade sob condições termoácidas, fazendo com que seja um excelente aditivo prebiótico em alimentos de caráter ácido, especialmente sucos de frutas (SEKI; SAITO, 2012). O xarope comercial de lactulose apresenta um conteúdo sólido de aproximadamente 80%, sendo 66% de lactulose e lactose em diferentes quantidades, bem como pequenas quantidades de epilactose, frutose, galactose e tagatose (NOOSHKAM; MADADLOU, 2016).

O início das pesquisas relacionadas à aplicação de lactulose como ingrediente alimentar funcional datam de 1957 (PETUELY, 1957; PANESAR; KUMARI, 2011; AÏT-AISSA; AÏDER, 2014) e desde então têm recebido bastante atenção devido às suas propriedades terapêuticas, bem como promotoras de saúde, o que faz com que seja considerado um dos compostos de maior valor comercial derivados da lactose (SCHUSTER-WOLFF-BÜHRING; FISCHER; HINRICHS, 2010; PANESAR; KUMARI, 2011; SONG et al., 2013; WANG et al., 2013). No setor alimentício, é utilizada como substituto do açúcar devido ao seu baixo teor calórico (PANESAR; KUMARI, 2011; SONG et al., 2013) e, por tratar-se de um carboidrato prebiótico, estimula o crescimento e/ou atividade de determinados microrganismos cuja ação no intestino é benéfica, tais como bifidobactérias e lactobacilos, em detrimento de organismos pouco desejados, como *Bacteroides*, *Clostridia*, *Enterobacteria* e *Salmonella* (CARDELLE-COBAS et al., 2009; PANESAR; KUMARI, 2011). Além disso, a lactulose tem sido usada há anos como um medicamento para o tratamento de constipação crônica e encefalopatia hepática em humanos e animais (SILVÉRIO et al., 2016), e também como nutracêutico (AIDER; HALLEUX, 2007; DONKOR et al., 2007; PANESAR; KUMARI, 2011).

Dentre os métodos que podem ser utilizados para sintetizar a lactulose, podemos citar os métodos químicos e enzimáticos. Aquele primeiro se dá através da isomerização química com o uso de catalisadores alcalinos e o segundo pela transgalactosilação de frutose catalisada por β -galactosidases. Além disso, observou-se sua produção por epimerização de lactose utilizando-se celobiose 2-epimerase (SCIENTIFIC et al., 1980; SCHUSTER-WOLFF-BÜHRING; FISCHER; HINRICHS, 2010; KIM; OH, 2012; SONG et al., 2013; AÏT-AISSA; AÏDER, 2014; GUERRERO et al., 2015). Contudo, em escala industrial, a lactulose é produzida exclusivamente por síntese química devido principalmente aos maiores rendimentos de produção (AIDER; HALLEUX, 2007; PANESAR; KUMARI, 2011; WANG et al., 2013). Sabe-se que o uso de catalisadores químicos, tais como o ácido bórico e o carbonato de cálcio, pode levar ao aumento da

taxa de isomerização, melhorando assim a eficiência do processo (PANESAR; KUMARI, 2011). No entanto, a utilização desses catalisadores químicos pode gerar, além de subprodutos indesejados, a mudança de coloração da lactulose, deixando-a com uma cor acastanhada, o que torna as etapas de *downstream* (separação e purificação) mais complexas e aumentam-se os custos de consumo de energia e do próprio processo produtivo (ZOKAEE et al., 2002). Desse modo, a produção de lactulose por síntese química torna-se limitada por tais problemas, fazendo com que a sua obtenção por via enzimática seja uma opção atrativa e desejável (GUERRERO et al., 2017; ALBUQUERQUE et al., 2018).

3.4 Produção de lactulose por via enzimática

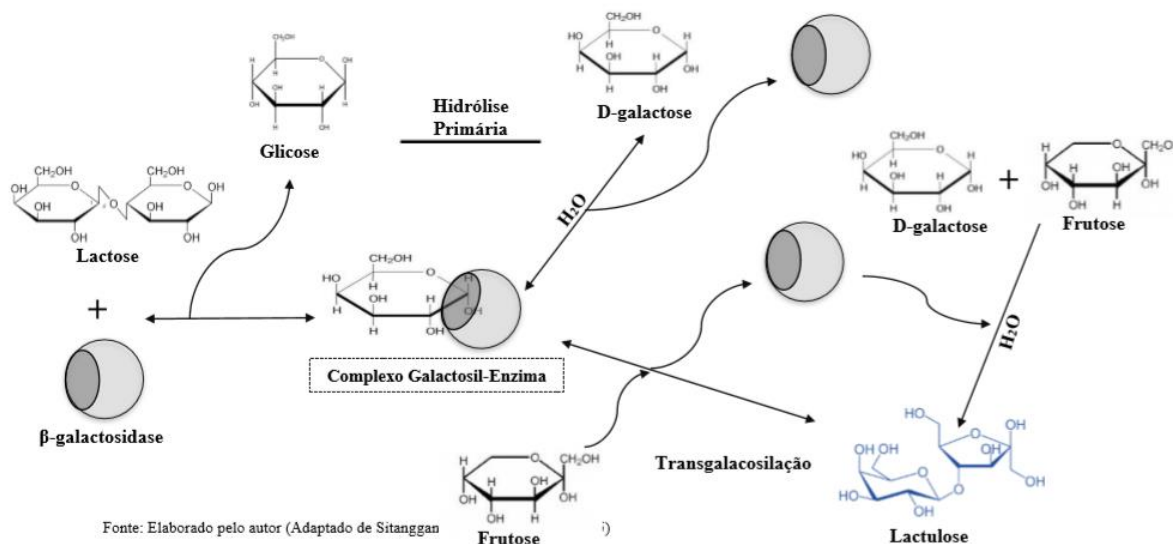
A síntese enzimática de lactulose tem como principais vantagens a transposição das dificuldades encontradas na produção por via química citadas anteriormente, bem como não requerer a utilização de substratos puros, podendo assim ser interligada ao processamento e transformação de um subproduto como, por exemplo, o soro de leite, em um prebiótico valioso (SCHUSTER-WOLFF-BÜHRING; FISCHER; HINRICHS, 2010; SILVÉRIO et al., 2016; GUERRERO et al., 2017).

As reações catalisadas por enzimas são geralmente conduzidas em condições brandas, logo, problemas como gasto energético e degradação do produto são reduzidos, fazendo com que o processo seja menos custoso. Somado a isso, as enzimas são geralmente bem aceitas nas indústrias de alimentos e farmacêutica, uma vez que apresentam características atrativas, como alta especificidade e seletividade, além de serem biodegradáveis (MAYER; KRANZ; FISCHER, 2010), promoverem uma “produção limpa” de lactulose e não necessitem de uma etapa de purificação complexa (KIM; OH, 2012).

Dentre as enzimas que podem catalisar a síntese de lactulose, as β -galactosidases são potencialmente aplicadas nas pesquisas científicas. No entanto, o seu uso gera uma baixa conversão e requer frutose como substrato da reação (BOING; DREWS; KRAUME, 2015). O primeiro estudo relacionado à síntese enzimática de lactulose utilizando-se a enzima β -galactosidase foi desenvolvido por Vaheri e Kaupinnen (VAHERI; KAUPINNEN, 1978), em um meio contendo lactose e frutose a 37 °C e pH 7,2, observando-se a síntese de 8,6 g/L de lactulose. Essa enzima atua catalisando a hidrólise de lactose, produzindo glicose e galactose. Dessa forma, o galactosil da lactose pode ser

transferido para uma hidroxila contendo um aceptor, a frutose, e promovendo a síntese de lactulose, conforme a Figura 1 (ALBUQUERQUE, 2018):

Figura 1 – Reações de hidrólise de lactose e síntese de lactulose catalisadas pelas β -galactosidases



Fonte: Albuquerque (2018).

Desde que foram iniciadas as pesquisas relacionadas à produção enzimática de lactulose, em 1978, tem-se investigado o uso de enzimas de diferentes fontes microbianas, tais como bactérias, leveduras e fungos filamentosos. Avalia-se também tanto a aplicação de enzimas livres quanto imobilizadas, partindo-se de diferentes metodologias para se obter os melhores resultados de síntese desse prebiótico (ALBUQUERQUE et al., 2018; NGUYEN et al., 2019; ABURTO et al., 2020; SCHMIDT et al., 2020).

3.5 Imobilização de enzimas

As enzimas imobilizadas podem ser definidas como aquelas que se encontram fisicamente confinadas ou localizadas em determinada região do espaço, com manutenção da sua atividade catalítica e podendo ser utilizadas de forma repetida e contínua (CHIBATA, 1978). Quando realizada de forma adequada, a imobilização pode melhorar determinadas características enzimáticas, tais como a estabilidade (pelas ligações multipontual ou pela imobilização de múltiplas subunidades), a atividade da enzima (pela geração de conformações mais ativas ou utilizando-se substrato interno ou

até mesmo gradientes de produto), a sua especificidade ou seletividade e também a sua pureza (BÖTTCHER; BORNSCHEUER, 2010; LÜTZ, 2013; VIRGEN-ORTÍZ et al., 2017; SATYAWALI et al., 2017). Do ponto de vista industrial, a principal vantagem da utilização de enzimas imobilizadas consiste na possibilidade de reutilização do biocatalisador (SHELDON; VAN PELT, 2013).

Diversas estratégias de imobilização de enzimas em suportes sólidos podem ser utilizadas, sendo uma delas a adsorção de enzimas em resinas de troca iônica (especialmente em trocadores aniônicos) (PESELA, 2003). Este tipo de imobilização é caracterizado pela formação de ligações mais fracas que as covalentes e, na presença de altas concentrações de substratos ionizáveis ou de mudanças de pH no decorrer da reação, podem ocasionar dessorção das enzimas imobilizadas, promovendo assim uma aparente inativação do derivado e, até mesmo, contaminação do produto (ROYER, 1980; KLIBANOV, 1983; ROSEVEAR, 1984).

Outra estratégia amplamente utilizada é a imobilização por ligação covalente. Dentre as suas principais vantagens, pode-se citar a obtenção de preparações consideravelmente estáveis e com vida útil prolongada quando comparadas com as obtidas por outros métodos de imobilização, devido a existência de uma interação mais forte (BORNSCHEUER, 2003; GRAZU et al., 2006; MATEO et al., 2006; ZAAK et al., 2017). A imobilização das enzimas ocorre devido a reações entre os resíduos de aminoácidos da proteína e os grupos funcionais presentes no suporte. Esse processo geralmente envolve duas etapas, sendo primeiramente a ativação do suporte com grupos funcionais, seguida pelo acoplamento da enzima ao suporte ativado por meio do estabelecimento da ligação covalente (ALBUQUERQUE, 2018). Dentre as estratégias de imobilização que podem ser utilizadas para imobilizar as β -galactosidases, podemos citar o uso de ligações covalentes (BORNSCHEUER, 2003; GRAZU et al., 2006; MATEO et al., 2006; ZAAK et al., 2017) e métodos de adsorção (YU et al., 2007; ADLERCREUTZ, 2013; MARTINS et al., 2013; KLEIN et al., 2016; ZAMZURI et al., 2017).

Sabe-se que as enzimas β -galactosidases podem tanto catalisar a reação de hidrólise de lactose, como também promover a síntese de oligossacarídeos, como a lactulose, através da reação de transgalactosilação. Quando essas enzimas são imobilizadas, o processo pode ser ainda mais eficaz, tendo sido relatados o uso de β -galactosidases de diferentes origens, tais como *Aspergillus oryzae* e *Kluyveromyces fragilis* (LADERO; SANTOS; GARCÍA-OCHOA, 2000; ZAAK et al., 2017). Diferentes suportes podem ser utilizados para imobilizar essas enzimas, e dentre eles podemos citar

MANAE-agarose, alginato de cálcio, sílica alumínio e quitosana ativada com glutaraldeído (LADERO; SANTOS; GARCÍA-OCHOA, 2000; REJIKUMAR; DEVI, 2001; BECERRA et al., 2001; ZAAK et al., 2017).

Albuquerque et al. (2018) observaram, em um experimento para se verificar a eficiência da β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* imobilizada por ligação covalente e submetida a vários ciclos de reação, que a mesma converteu lactose a glicose e galactose acima de 50% até o terceiro ciclo reacional. Todavia, já no sexto e último ciclo avaliado, houve a conversão de cerca de 20% de lactose. Com relação à produção de lactulose, notou-se que no terceiro ciclo foi sintetizado 62,8% em relação ao ciclo inicial, enquanto que no sexto ciclo de reuso a síntese de lactulose atingiu uma conversão de 24,7%, apresentando assim uma redução significativa. Já com relação à atividade enzimática do derivado, a mesma manteve-se acima de 50% até o sexto ciclo de reuso. No entanto, como apontado anteriormente, nesse ponto, a produção de lactulose já havia sido substancialmente reduzida (cerca de 25% com relação ao primeiro uso). Esses resultados mostram que os biocatalisadores utilizados para a produção biotecnológica de lactulose utilizando-se β -galactosidases ainda apresentam uma baixa estabilidade operacional, além de ocorrer perda de atividade durante a reutilização do biocatalisador. Por esta razão, propõe-se revestir os suportes com polietilenimina (PEI), um polímero multifuncional, com a finalidade de se melhorar a estabilidade dos biocatalisadores obtidos.

3.6 Revestimento de suportes com polietilenimina (PEI)

A polietilenimina (PEI) é um polímero multifuncional sintético extensivamente utilizado em diversas aplicações devido à funcionalidade química que apresenta, sendo esta em decorrência da presença de amins catiônicas primárias (25%), secundárias (50%) e terciárias (25%). O PEI é formado pela ligação de unidades de iminoetileno, podendo apresentar conformações lineares, ramificadas, dos tipos dendrímicas, pente e rede, dependendo do método de obtenção e modificação utilizados. Essas características têm uma grande influência nas suas propriedades físicas e químicas e possibilita a sua obtenção em diferentes pesos moleculares (VIRGEN-ORTÍZ et al., 2017).

Esse polímero possui características atraentes para as mais diversas aplicações como: baixa toxicidade, facilidade de separação e reciclagem e ser inodoro. Além disso, é solúvel em solventes polares, tais como água, acetona e etanol, e dependendo do peso molecular que possui, é parcialmente solúvel em benzeno e tetrahidrofurano. Outra

característica desejável, do ponto de vista econômico, é que o PEI possui uma alta densidade de carga iônica, tornando-o um material mais rentável (possibilita o alcance dos mesmos carregamentos utilizando-se menores quantidades de polímero) quando comparado com outros tipos de suportes (PESELA et al., 2005; VIRGEN-ORTÍZ et al., 2017).

A imobilização reversível de enzimas em suportes revestidos com PEI pode ser empregada para obtenção de adsorções muito intensas, porém pouco distorcidas dessas proteínas (WEAVER; CARTA, 1996; MATEO et al., 2000B; PESELA et al., 2005; LUCAS et al., 2010; VIRGEN-ORTÍZ et al., 2017). Além disso, as enzimas imobilizadas em suportes que recebem tal revestimento podem ser utilizadas sob um amplo conjunto de condições. Estudos já realizados com PEI relataram a obtenção de estabilizações significativas como, por exemplo, para o caso de enzimas multiméricas, sendo a β -galactosidase um exemplo desse grupo de enzimas (BLANCO; CALVETE; GUIÁN, 1989; GIANFREDA; SCARFI, 1991; FERNÁNDEZ-LAFUENTE et al., 1999). De fato, a polietilenimina tem sido utilizada para se melhorar o desempenho de uma grande variedade de enzimas por razões diversas (HATTI-KAUL, 1999; ANDERSSON; BRECCIA; HATTI-KAUL, 2000; BRECCIA; ANDERSSON; HATTI-KAUL, 2002; ANDERSSON; BOLIVAR et al., 2009; GARCIA-GALAN; BARBOSA; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2013), sendo muito empregada na co-imobilização de enzimas como uma forma de se capturar cofatores e enzimas fosforiladas, permitindo assim o seu reuso por vários ciclos (VELASCO-LOZANO; BENÍTEZ-MATEOS; LÓPEZ-GALLEGO, 2017).

Ao serem imobilizadas em suportes revestidos com PEI, as proteínas interagem com um leito constituído por um polímero flexível carregado positivamente. Logo, as proteínas adsorvem e penetram no leito polimérico carregado, promovendo a interação em um determinado volume do material ao invés de ser apenas em uma superfície plana como acontece nas imobilizações covalentes quando se utiliza apenas o suporte (TORRES et al., 2006). Com isso, uma maior porção da superfície da enzima interage com o suporte e, por este ser flexível e ser capaz de se moldar a estrutura da enzima, esta não sofre alterações conformacionais indesejáveis que podem prejudicar seu desempenho. Alguns estudos (KUMAR; GALAEV; MATTIASSON, 2000; MATEO et al., 2000B) mostram que suportes revestidos com polietilenimina são capazes de adsorver de forma reversível e sem promover distorção certas proteínas como β -galactosidase de *Aspergillus oryzae*, lipase de *Candida rugosa* (LCR) e D-aminoácido oxidase (DAAO)

de *Rhodotorula gracilis*, que normalmente não são adsorvidas em suportes convencionais.

Com base nestas propriedades do PEI, pretende-se desenvolver uma estratégia de imobilização para a β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* usando este polímero para se aprimorar as propriedades do catalisador.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Material

4.1.1 Reagentes

Glicidol, glutaraldeído 25% (v/v), *o*-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo (*o*NPG) e polietilenimina (PEI) foram obtidos da Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO). Acetato de sódio, ácido acético, ácido bórico, ácido fosfórico, frutose, fosfato de potássio monobásico, fosfato de potássio dibásico, hidróxido de potássio, hidróxido de sódio, lactose e tetraborato de sódio foram obtidos da Dinâmica Química Contemporânea Química LTDA (Indaiatuba, São Paulo, Brasil). Quitosana em pó, com grau de desacetilação de 85,2%, foi adquirida da Polymar Ind. Ltda (Fortaleza, Ceará, Brasil), e a agarose foi obtida da GE Healthcare (Chicago, Illinois, EUA). O soro de leite desmineralizado em pó foi gentilmente doado pela Sorvetes Frosty (Maracanaú, Ceará, Brasil).

4.1.2 Enzima utilizada

β -galactosidase (E.C. 3.2.1.23) de *Kluyveromyces lactis*, Lactozyme® 2600, utilizada nos experimentos foi adquirida da Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO). A concentração de proteína e a atividade do extrato comercial eram 6,0 mg/mL e 436,29 U/mL, respectivamente.

4.2 Métodos

4.2.1 Determinação da atividade da enzima β -galactosidase pela hidrólise do substrato ONPG

A atividade hidrolítica da β -galactosidase utilizando-se o substrato *o*NPG foi determinada a 37 °C, pH 6,6 e 50 mM. O coeficiente de extinção molar do produto *o*-nitrofenol (*o*NPG) foi de 4,53 L/mol.cm⁻¹. O produto da reação de hidrólise foi determinado por espectrofotometria a 420 nm. Para enzimas solúveis ou imobilizadas, 2 mL de substrato *o*NPG 1,25 mM (diluído em tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 6,6)

contendo 0,1 mM de MnCl_2) foram colocados em cubeta de vidro. Em seguida, adicionou-se 50 μL do extrato enzimático ou 0,1 g do derivado contendo β -galactosidase. A reação foi conduzida por 2 min e, ao final, o slope foi lido e a atividade enzimática calculada de acordo com a equação 1:

$$A \left(\frac{U}{\text{mL}} \right) = \left(\frac{\text{slope} \times V_t}{\epsilon \times L \times V_e} \right) \times 100, \quad (1)$$

sendo: slope – absorbância lida por tempo (min); V_t – volume total (mL); V_e – volume de enzima (mL); L – caminho óptico (1 cm); ϵ – coeficiente de extinção ($4,53 \text{ L/mol.cm}^{-1}$).

Uma unidade (U) de β -galactosidase é definida como a quantidade de enzima que libera 1 μmol de o-nitrofenol por minuto, sob as mesmas condições utilizadas no ensaio. Para se calcular a atividade do derivado, utilizou-se a mesma equação descrita anteriormente, substituindo-se apenas o parâmetro V_e (volume de enzima) por m_d (massa de derivado, em g).

4.2.2 Preparação dos suportes

Foram avaliados quatro diferentes suportes na imobilização da β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis*: quitosana ativada com glutaraldeído (Qui_Glu); quitosana ativada com glutaraldeído e revestida com polietilenimina (PEI) (Qui_Glu_PEI); agarose ativada com glicidol (Aga_Gli) e agarose ativada com glicidol e revestida com PEI (Aga_Gli_PEI), obtidos como descritos nos tópicos a seguir (4.2.2.1 a 4.2.2.4).

4.2.2.1 Quitosana ativada com glutaraldeído (Qui_Glu)

A quitosana ativada com glutaraldeído foi obtida conforme metodologia descrita por Lima et al. (2013) e Budriene et al. (2005). A quitosana em pó foi solubilizada em solução de ácido acético (CH_3COOH) 2% (v/v) na proporção de 2% (m/v), sob agitação e aquecimento moderado. O gel de quitosana obtido foi coagulado com hidróxido de potássio (KOH) 0,5 M até completa homogeneização. Em seguida, as partículas de quitosana foram ativadas com uma solução de glutaraldeído 0,8% (v/v), sob agitação por 30 min a 50 °C. O suporte obtido foi lavado com água destilada em excesso e em seguida com tampão fosfato de potássio (KH_2PO_4) 100 mM (pH 7,0) (Fig. 2-A).

4.2.2.2 Quitosana ativada com glutaraldeído e revestida com polietilenimina (PEI) (Qui_Glu_PEI)

A quitosana ativada com glutaraldeído e revestida com PEI foi obtida de acordo com Pessela et al. (2005) com modificações. O suporte Qui_Glu foi suspenso em solução de 10 % (m/v) de PEI e agitado suavemente por 3 h a 25 °C. Em seguida, foi adicionada lentamente 10 mg/mL de solução de boridreto de sódio (NaBH_4) e a mistura foi agitada por 2h. O suporte foi filtrado e lavado com tampão acetato de sódio ($\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$) 100 mM (pH 4,0), tampão borato de sódio ($\text{Na}_2[\text{B}_4\text{O}_5(\text{OH})_4] \cdot 8\text{H}_2\text{O}$) 100 mM (pH 9,0) e finalmente com água destilada em excesso (Fig. 2-B).

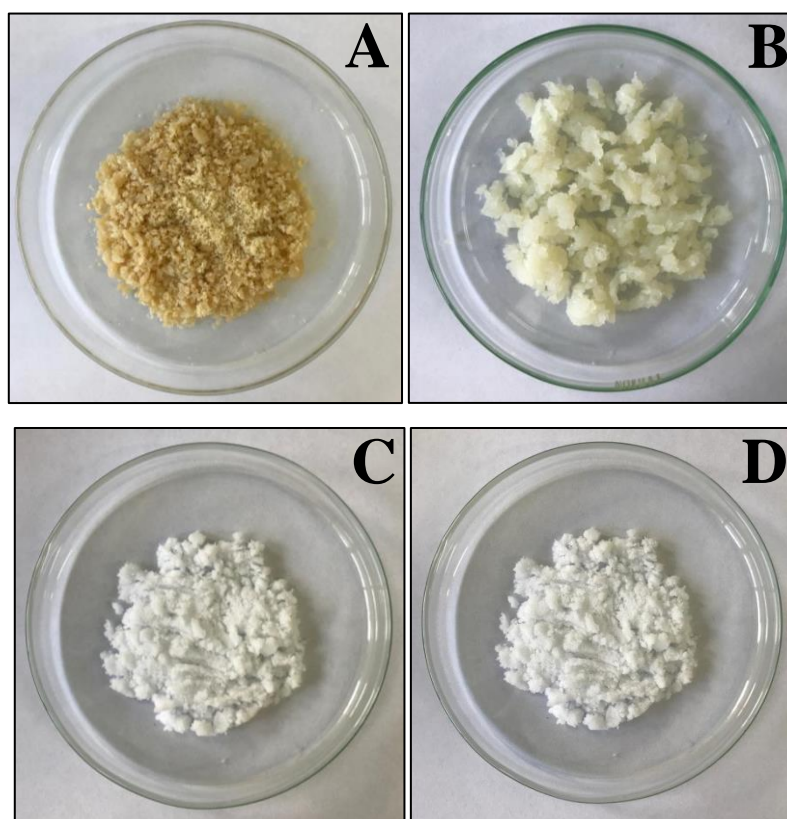
4.2.2.3 Agarose ativada com glicidol (Aga_Gli)

A agarose ativada com glicidol foi obtida de acordo com Guisán (1988) com modificação. Os suportes foram obtidos por esterificação dos grupos hidroxila (-OH) com glicidol, seguida de oxidação com metaperiodato de sódio (NaIO_4). O suporte foi ressuspenso em água destilada na proporção de 1/10 (m/v) e a suspensão foi mantida sob agitação suave. Uma solução de hidróxido de sódio (NaOH) 1,7 M e boridreto de sódio 0,75 M (NaBH_4) equivalente a 1/3 (m/v) da massa de suporte foi preparada e lentamente adicionada à suspensão, sob agitação e em banho de gelo. Então, ainda nas mesmas condições, 48% (m/v) de reagente glicidol foi adicionado lentamente. A suspensão foi mantida sob agitação mecânica em um recipiente aberto por 18 h a 25 °C. O suporte foi seco sob vácuo e lavado com água destilada em excesso. Após esta etapa, os grupos gliceril formados na superfície de suporte foram oxidados em glioxil suspendendo-se o suporte em água destilada na proporção de 1/10 (m/v) e adicionando 300 μmols de NaIO_4 por grama de suporte. A oxidação foi mantida sob agitação suave por 2 h a 25 °C. O suporte oxidado foi lavado com água destilada em excesso e armazenado sob refrigeração (Fig. 2-C).

4.2.2.4 Agarose ativada com glicidol e revestida com PEI (Aga_Gli_PEI)

O suporte Aga_Gli foi revestido com PEI de acordo com o mesmo procedimento realizado para o suporte Qui_Glu_PEI, descrito no tópico 4.2.2.2 (Fig. 2-D).

Figura 2 – Aspecto visual dos suportes de: quitosana ativada com glutaraldeído (A); quitosana ativada com glutaraldeído e revestida com PEI (B); agarose ativada com glicidol (C); agarose ativada com glicidol e revestida com PEI (D)



Fonte: Elaborado pelo autor (2019).

4.2.3 Caracterização dos suportes e biocatalisadores obtidos

4.2.3.1 Análise por Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

A fim de se investigar as mudanças provocadas com ativações e revestimentos com PEI dos suportes de quitosana e agarose, foram analisadas as possíveis alterações dos constituintes desses materiais através da técnica de reflexão total atenuada (ATR). As amostras foram analisadas em espectrômetro de Transformada de Fourier Cary 630 da *Agilent Technologies*, na faixa de 4000 e 650 cm^{-1} , com uma média de 32 varreduras e 1 cm^{-1} de resolução espectral.

4.2.4 Avaliação da imobilização da enzima β -galactosidase

O processo de imobilização da enzima β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* foi o mesmo para todos os suportes avaliados, utilizando-se uma carga enzimática de 10 mg de proteína por g de suporte e realizado a pH 7,0 e 25 °C em tampão KH_2PO_4 100 mM contendo 0,1 mM de MnCl_2 e 0,2 mM de MgCl_2 , sob agitação suave em agitador rotatório. A presença de cátions metálicos, como Mg^{2+} e Mn^{2+} , é eficaz para a atuação de β -galactosidasas, influenciando diretamente na sua atividade enzimática (ALBUQUERQUE et al., 2018).

Diferentes tempos de imobilização (15, 30, 60, 120, 180 e 360 min) foram avaliados. Nos tempos fixados, amostras de sobrenadante e suspensão foram coletadas e as atividades enzimáticas foram determinadas, bem como foram calculados os parâmetros de imobilização (eficiência, rendimento de imobilização, atividade oferecida e atividade do biocatalisador).

4.2.5 Determinação dos parâmetros de imobilização

Os seguintes parâmetros de imobilização foram calculados, de acordo com Sheldon e van Pelt (2013) (Equações 2, 3, 4 e 5):

- *Atividade inicial ou oferecida (U/g)*: A atividade inicial descreve a atividade enzimática oferecida ao suporte no início da imobilização:

$$A_{\text{inicial}} = \left(\frac{\text{atividade branco}}{\text{massa de suporte}} \right) \times \text{volume de solução enzimática}, \quad (2)$$

- *Rendimento de imobilização (%)*: O rendimento de imobilização descreve a porcentagem da atividade enzimática total da solução de enzima livre que está imobilizada:

$$R = \left(\frac{\text{atividade imobilizada}}{\text{atividade inicial}} \right) \times 100, \quad (3)$$

sendo a "atividade imobilizada" calculada subtraindo-se a atividade enzimática residual total que permanece na solução de enzima após a imobilização pela atividade inicial total.

- *Eficiência (%)*: A eficiência da imobilização descreve a porcentagem de atividade da enzima que é observada no imobilizado:

$$E = \left(\frac{\text{atividade observada}}{\text{atividade imobilizada}} \right) \times 100, \quad (4)$$

- *Atividade do biocatalisador (U/g)*: A atividade do biocatalisador descreve a atividade enzimática apresentada pelo biocatalisador após a imobilização:

$$A_{\text{biocatalisador}} = \left(\frac{\text{slope} \times V_t}{\epsilon \times L \times m_d} \right), \quad (5)$$

sendo: slope – absorvância lida por tempo (min); V_t – volume total (mL); m_d – massa do derivado (g); L – caminho óptico (1 cm); ϵ – coeficiente de extinção (4,53 L/mol.cm⁻¹).

4.2.6 Estabilidade térmica dos biocatalisadores

A estabilidade térmica dos biocatalisadores obtidos foi avaliada a 50 °C em tampão KH₂PO₄ 50 mM (pH 6,6), contendo 0,1 mM de MnCl₂. As amostras foram coletadas periodicamente e a atividade enzimática foi determinada conforme descrito no tópico 4.2.1. O tempo de meia-vida foi calculado de acordo com o modelo proposto por Sadana e Henley (SADANA E HENLEY, 1987).

4.2.7 Eficiência catalítica dos biocatalisadores na hidrólise de lactose e produção de lactulose

Para avaliar a eficiência dos biocatalisadores obtidos, foram realizadas reações simultâneas de hidrólise de lactose e produção de lactulose. Os experimentos foram conduzidos em frascos Erlenmeyer de 25 mL contendo solução sintética de lactose suplementada com frutose, na proporção de 1:2 de lactose/frutose, com uma concentração inicial total de substrato de 200 g.L⁻¹, em tampão KH₂PO₄ 50 mM (pH 7,0) (ALBUQUERQUE et al., 2018). A carga enzimática utilizada foi de 4 U/mL e a reação foi conduzida sob agitação orbital a 120 rpm e 50 °C por 120 min. Amostras foram coletadas periodicamente e as reações foram interrompidas por aquecimento a 100 °C por 2 min, e em seguida foram analisadas para se determinar as concentrações de carboidratos.

4.2.8 Avaliação da produção de lactulose usando soro de leite

Avaliou-se a produção de lactulose utilizando-se soro de leite como substrato, o qual continha aproximadamente 72% (m/m) de lactose. As reações foram conduzidas nas mesmas condições reportadas no tópico 4.2.7. Amostras foram coletadas periodicamente e as reações foram interrompidas por aquecimento a 100 °C por 2 min, e em seguida foram analisadas para determinar as concentrações de carboidratos.

Os seguintes parâmetros foram utilizados para avaliar a síntese de lactulose (Equações 6, 7 e 8):

- *Conversão de lactose* (X_{LA}): representa a porcentagem de lactose convertida durante a hidrólise:

$$X_{LA} = \left(\frac{[LA]_0 - [LA]_f}{[LA]_0} \right) \times 100, \quad (6)$$

sendo $[LA]_0$ e $[LA]_f$ a concentração inicial e final de lactose em g/L, respectivamente.

- *Rendimento de lactulose* (Y_{LU}): é a razão entre a massa de lactulose produzida no processo (m_{LU}) e a massa inicial de lactose (m_{LA}), avaliada na concentração máxima de lactulose obtida durante o processo:

$$Y_{LU} = \frac{m_{LU}}{m_{LA}}, \text{ em g de lactulose por g de lactose.} \quad (7)$$

- *Produtividade* (q): é definida como a razão entre a concentração máxima de lactulose (g/L) e o tempo (em horas) necessário para obtê-la, expresso em mg/(L.h):

$$q = \frac{[LU]_{max}}{t_{[LU]_{max}}}. \quad (8)$$

4.2.9 Estabilidade operacional

A estabilidade operacional dos biocatalisadores sintetizados no processo de hidrólise de lactose e produção de lactulose foi conduzida em frascos Erlenmeyer de 25 mL contendo solução sintética de lactose ou soro de leite, ambas suplementadas com frutose na proporção de 1:2 de lactose/frutose, com uma concentração inicial total de substrato de 200 gL⁻¹ e diluídas em tampão fosfato 50 mM (pH 7,0). A carga enzimática

utilizada foi 4 U/mL e as reações foram conduzidas nas mesmas condições descritas no tópico 4.2.7. Após o final de cada ciclo, a massa de derivado foi coletada, lavada, seca e pesada, e um novo ciclo reativo foi iniciado. Ao total, foram realizados 10 ciclos (bateladas consecutivas) de hidrólise e transgalactosilação simultâneas.

4.2.10 Métodos analíticos

A concentração de proteínas foi obtida pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). O padrão utilizado foi a albumina de soro bovino (ASB), adquirida da Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO).

As concentrações de lactose, lactulose, glicose, frutose e galactose foram determinadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (Thermo Finnigan Surveyor HPLC System, Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, EUA), usando um detector de índice de refração e Coluna Supelco 610-H a 30 °C. O eluente usado foi solução de ácido fosfórico (H₃PO₄) 0,1% (v/v), a uma taxa de fluxo de 0,5 mL.min⁻¹. O volume de injeção foi de 20 µL e os padrões usados foram obtidos da Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO).

4.2.11 Análise estatística

Os resultados de imobilização, hidrólise de lactose e produção de lactulose foram analisados por análise de variância (ANOVA), utilizando-se o teste de Tukey, e os intervalos mínimos de diferença de significância foram julgados de acordo com o valor de *p*, determinado em um nível de significância de 5 % ($p < 0,05$).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Avaliação da imobilização da enzima β -galactosidase e estabilidade térmica dos biocatalisadores

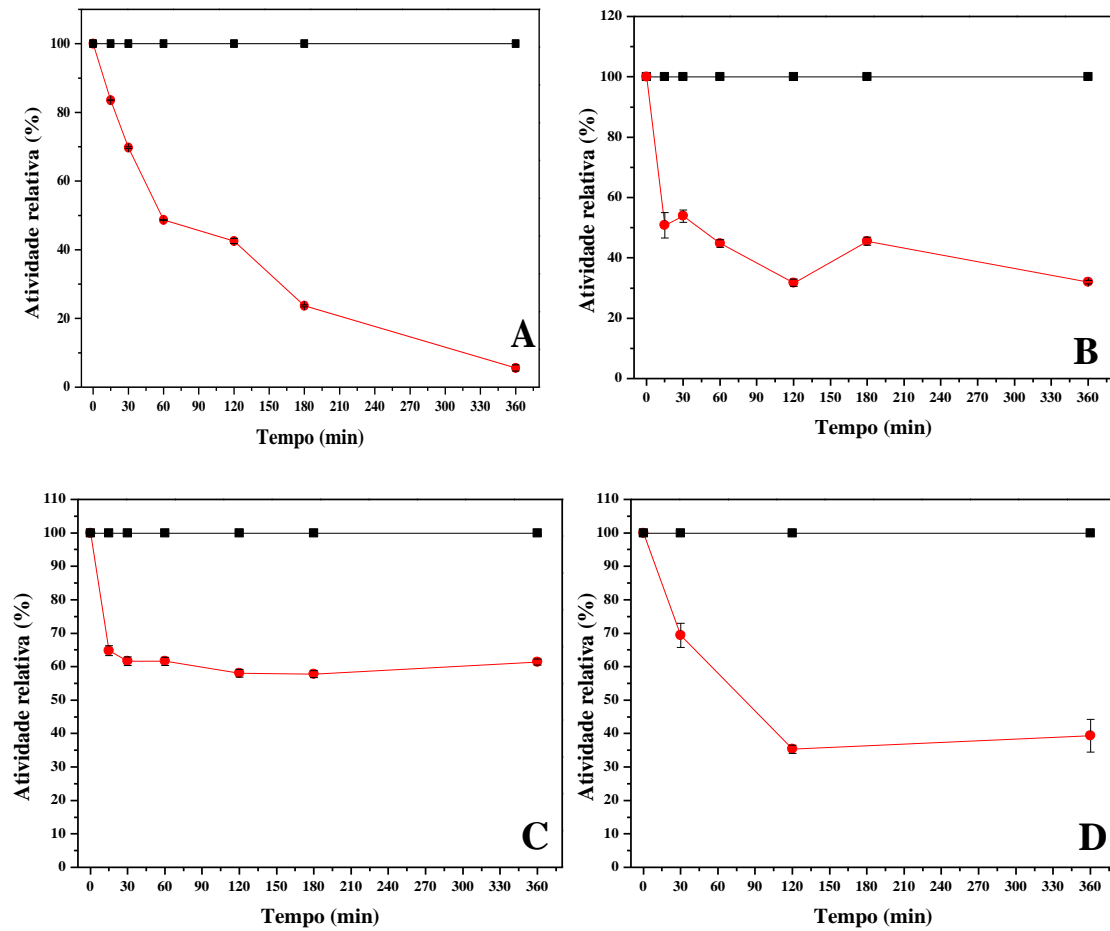
Avaliou-se o curso de imobilização da enzima β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* nos suportes Qui_Glu, Qui_Glu_PEI, Aga_Gli e Aga_Gli_PEI a 25 °C, pH 7,0 e 100 mM, e os resultados estão apresentados na Figura 3. A partir da observação do perfil do controle (branco) (Figs. 3-A, B, C e D), nota-se que não ocorreu desnaturação enzimática nas condições em que foi conduzido o processo de imobilização.

Observou-se que, ao tempo de 2h de imobilização, as atividades dos sobrenadantes para os biocatalisadores de quitosana sem e com revestimento com PEI foram 47,1 U/mL e 51,7 U/mL, respectivamente (Figs. 3-A e B). Os biocatalisadores obtidos apresentaram uma atividade de 38,93 U/g e 36,64 U/g. Após esse tempo, observa-se que o comportamento dos gráficos no decorrer do curso de imobilização usando o suporte Qui_Glu diminuiu, mas não foi observado um aumento na atividade do biocatalisador, diferente do observado no curso de imobilização usando o suporte revestido com o PEI em que a atividade enzimática do sobrenadante manteve-se relativamente constante, bem como a atividade do biocatalisador. Com 6h de imobilização, os biocatalisadores Qui_Glu_Gal e Qui_Glu_PEI_Gal apresentam valores de atividade de 39,95 U/g e 37,03 U/g, respectivamente, não havendo uma diferença significativa com os valores observados com 2 h de imobilização.

No estudo do curso de imobilização usando agarose ativada com glioxil (Aga_Gli) observa-se uma maior diminuição na atividade do sobrenadante quando o suporte foi revestido com PEI ($57,2 \pm 1,8$ U/mL e $52,1 \pm 1,4$ U/mL sem e com revestimento com o PEI, respectivamente), e não se observou uma diferença nos resultados obtidos com 2 h e 6 h de imobilização. Outro fato observado é que rapidamente a atividade do sobrenadante diminuiu no suporte sem o revestimento com o PEI, com 15 min de imobilização, e manteve-se praticamente constante com o tempo. Provavelmente isto ocorreu devido a forma de interação entre os grupos funcionais do suporte com aminoácidos residuais da enzima que serão apresentados e explicados no decorrer deste tópico.

Então, selecionou-se o tempo de 2h para imobilização da enzima β -galactosidase nos suportes avaliados e os parâmetros de imobilização estão apresentados na Tabela 1.

Figura 3 – Curso de imobilização da β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* a pH 7,0 e 25 °C em tampão fosfato de potássio 100 mM contendo $MnCl_2$ 0,1 mM e $MgCl_2$ 0,2 mM, sob agitação suave durante 6 h. β -galactosidase imobilizada em: quitosana ativada com glutaraldeído (A); quitosana ativada com glutaraldeído e revestida com PEI (B); (C) agarose ativada com glicidol; (D) agarose ativada com glicidol e revestida com PEI. (■) controle (branco); (●) sobrenadante



Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

Tabela 1 - Parâmetros de imobilização obtidos no processo realizado a pH 7,0 e 25 °C em tampão fosfato de potássio 100 mM contendo MnCl₂ 0,1 mM e MgCl₂ 0,2 mM, sob agitação suave por 2 h. β-galactosidase imobilizada em: quitosana ativada com glutaraldeído (Qui_Glu); quitosana ativada com glutaraldeído e revestida com PEI (Qui_Glu_PEI); agarose ativada com glicidol (Aga_Gli); agarose ativada com glicidol e revestida com PEI (Aga_Gli_PEI). Letras diferentes representam diferenças estatísticas em um nível de confiança de 95% ($p < 0,05$)

Biocatalisador	Eficiência (%)	Rendimento de imobilização (%)	Atividade oferecida (U/g)	Atividade do biocatalisador (U/g)
Qui_Glu_Gal	3,51 ± 0,31 ^b	57,44 ± 4,35 ^c	1111,74 ± 62,47 ^a	38,93 ± 1,17 ^c
Qui_Glu_PEI_Gal	3,47 ± 0,27 ^b	54,78 ± 1,64 ^{b,c}	1058,18 ± 28,29 ^a	36,64 ± 1,90 ^c
Aga_Gli_Gal	3,67 ± 0,08 ^b	51,56 ± 1,89 ^b	1129,31 ± 21,29 ^a	41,49 ± 1,01 ^b
Aga_Gli_PEI_Gal	8,23 ± 0,37 ^a	89,74 ± 0,01 ^a	709,35 ± 20,80 ^b	58,37 ± 0,90 ^a

Fonte: Elaborado pelo autor (2019).

O revestimento dos suportes com PEI melhorou consideravelmente os parâmetros de imobilização: rendimento de imobilização e atividade do biocatalisador para agarose e não influenciou no processo usando a quitosana como suporte (Tabela 1).

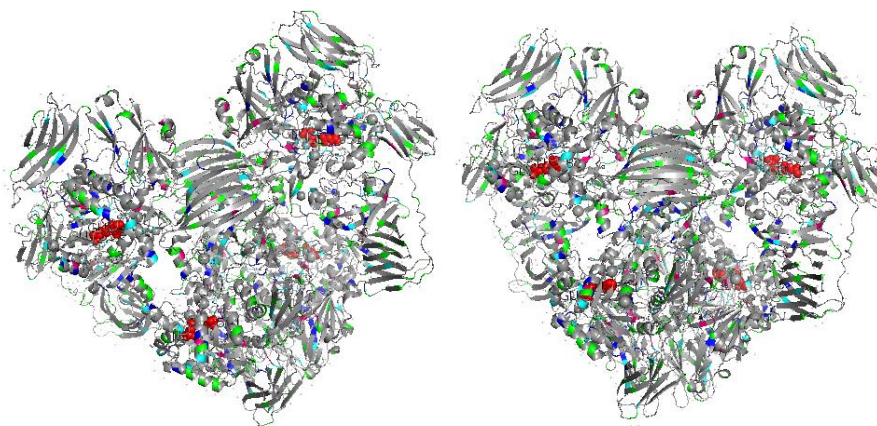
Para os suportes de quitosana, o rendimento de imobilização foram 57,44 ± 4,35% e 54,8 ± 1,64% sem e com o suporte revestido com o polímero. As atividades dos biocatalisadores não apresentaram uma diferença significativa, 38,93 ± 1,17 U/g e 36,64 ± 1,90 U/g para os suportes de quitosana sem e com revestimento, respectivamente.

No entanto, observou-se que o PEI influenciou no processo de imobilização usando agarose, ocorrendo uma melhor performance da imobilização: rendimento de imobilização (1,7 vezes maior) e atividade dos biocatalisadores obtidos (1,4 vezes maior) para suportes de agarose revestidos (Aga_Gli_PEI) quando comparados aos suportes não revestidos (Aga_Gli). Os biocatalisadores obtidos com o suporte Aga_Gli apresentaram uma maior atividade 41,49 ± 1,01 U/g e 58,37 ± 0,90 U/g sem e com o revestimento, respectivamente. O PEI tem sido usado para melhorar o desempenho de uma ampla variedade de enzimas, pois provoca distorção mínima da enzima, evita a dissociação de suas subunidades multiméricas e promove uma fixação mais forte ao suporte

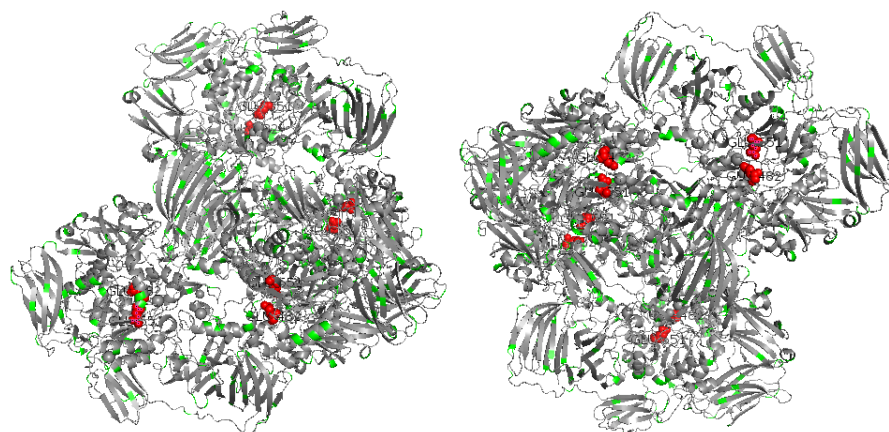
(ANDERSSON et al., 2000; ANDERSSON E HATTI-KAUL, 1999; BOLIVAR et al., 2009; BRECCIA et al., 2002; GARCIA-GALAN et al., 2013; PESSELA et al., 2005, 2003).

No entanto, tanto os biocatalisadores sem recobrimento com PEI quanto aqueles que tiveram a adição desse polímero, apresentaram uma baixa eficiência de imobilização. Uma hipótese para que isso tenha ocorrido é que, ao se oferecer uma alta carga enzimática, o sistema pode ter sofrido limitações difusionais e impedimento estérico, conforme observado por estudos de Silva et al. (2012), reduzindo, assim, a eficiência da imobilização

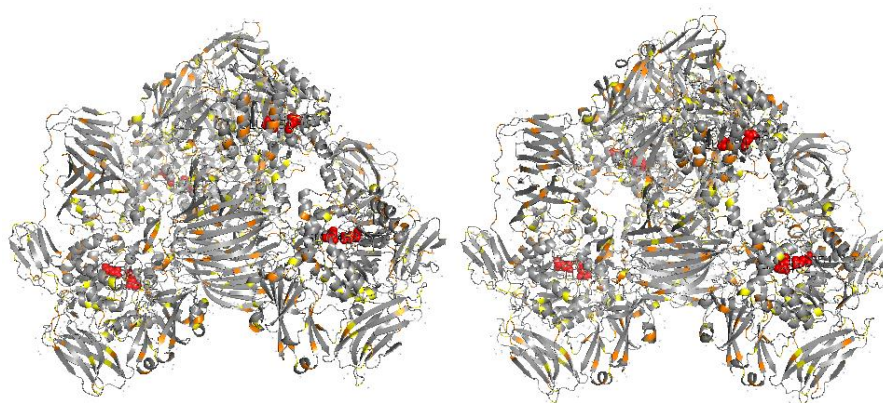
Figura 4 - Estrutura da β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* destacando-se os resíduos de aminoácidos (lisina (verde); arginina (azul escuro); histidina (azul claro); triptofano (rosa); asparmato (amarelo); glutamato (laranja)) e os resíduos que participam do sítio ativo ((GLU 482 e GLU 551) em vermelho e formato de esfera (PDB code: 30B8)). (A) Resíduos que reagem com o glutaraldeído; (B) Resíduos que reagem com o glicidol; (C) Resíduos que reagem com o PEI



(A)



(B)



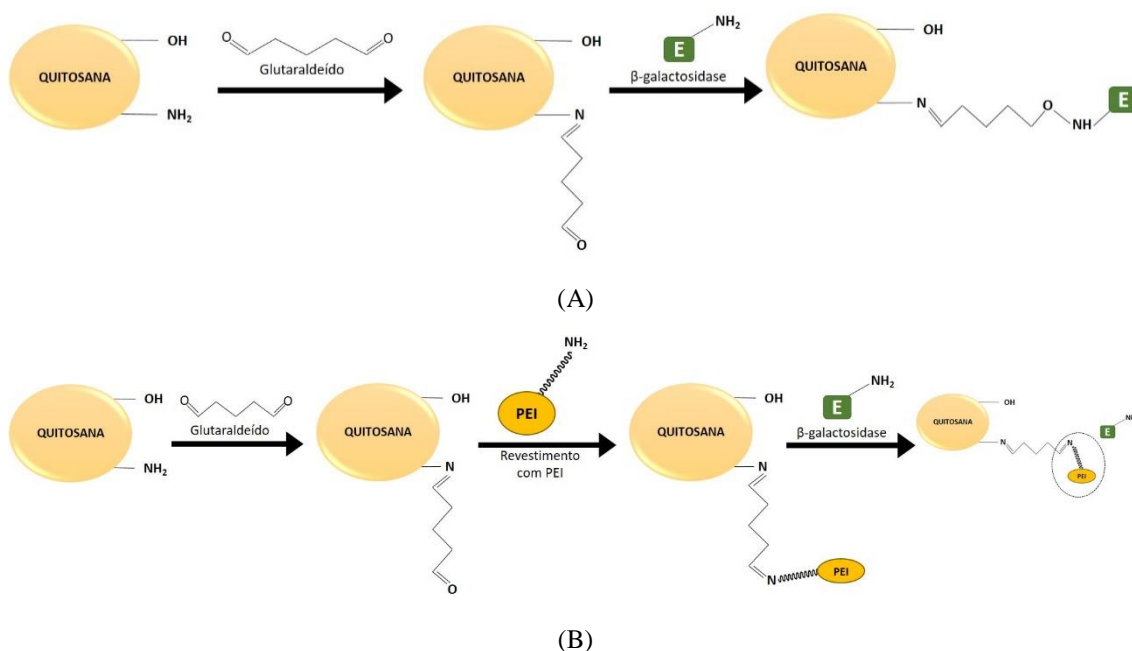
(C)

Fonte: Elaborado pelo autor (2019).

As estratégias de imobilização utilizadas neste estudo foram escolhidas com o objetivo de otimizar o processo de imobilização e estão esquematizadas nas Figuras 5 e 6. A quitosana possui grupos funcionais amina e hidroxila disponíveis para interação com o agente de ativação e com a enzima (URRUTIA et al., 2018). O glutaraldeído trata-se de uma molécula bifuncional com dois grupos aldeídos em suas extremidades. Um desses grupos pode reagir com o grupo amino da quitosana ocorrendo a formação de ligação do tipo N=C (KLEIN et al., 2016; URRUTIA et al., 2018), e na outra extremidade da molécula de glutaraldeído, o C=O livre pode se ligar aos grupos amino da enzima (Fig. 4-A). Os grupos hidroxila disponíveis na superfície da quitosana ainda podem reagir com os grupos amino residuais da enzima, mas forma ligações mais fracas que podem ser facilmente quebradas (URRUTIA et al., 2018).

Ao revestir o suporte ativado com PEI, esse possui grupos amino que interagem diretamente com os demais grupos aldeídos do glutaraldeído, possibilitando a sua ligação ao suporte (ELNASHAR et al., 2014). Além disso, o PEI pode ligar-se também aos grupos amino da quitosana que não interagiram com o glutaraldeído. Finalmente, a enzima é adicionada à preparação e é imobilizada na maior parte por adsorção multiponto (PESSELA et al., 2005), como mostrado na Fig. 5-B, cujos resíduos negativos da enzima reagem com as cargas positivas do PEI (Fig. 4-C). Escolheu-se essa estratégia de imobilização, pois o PEI impede a dissociação de enzimas multiméricas, podendo interagir simultaneamente com várias subunidades enzimáticas (BOLIVAR et al., 2009; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2009). Além disso, a enzima pode ser imobilizada, ainda que em menor grau, por ligação covalente com os grupos aldeído do suporte que não interagem com o PEI.

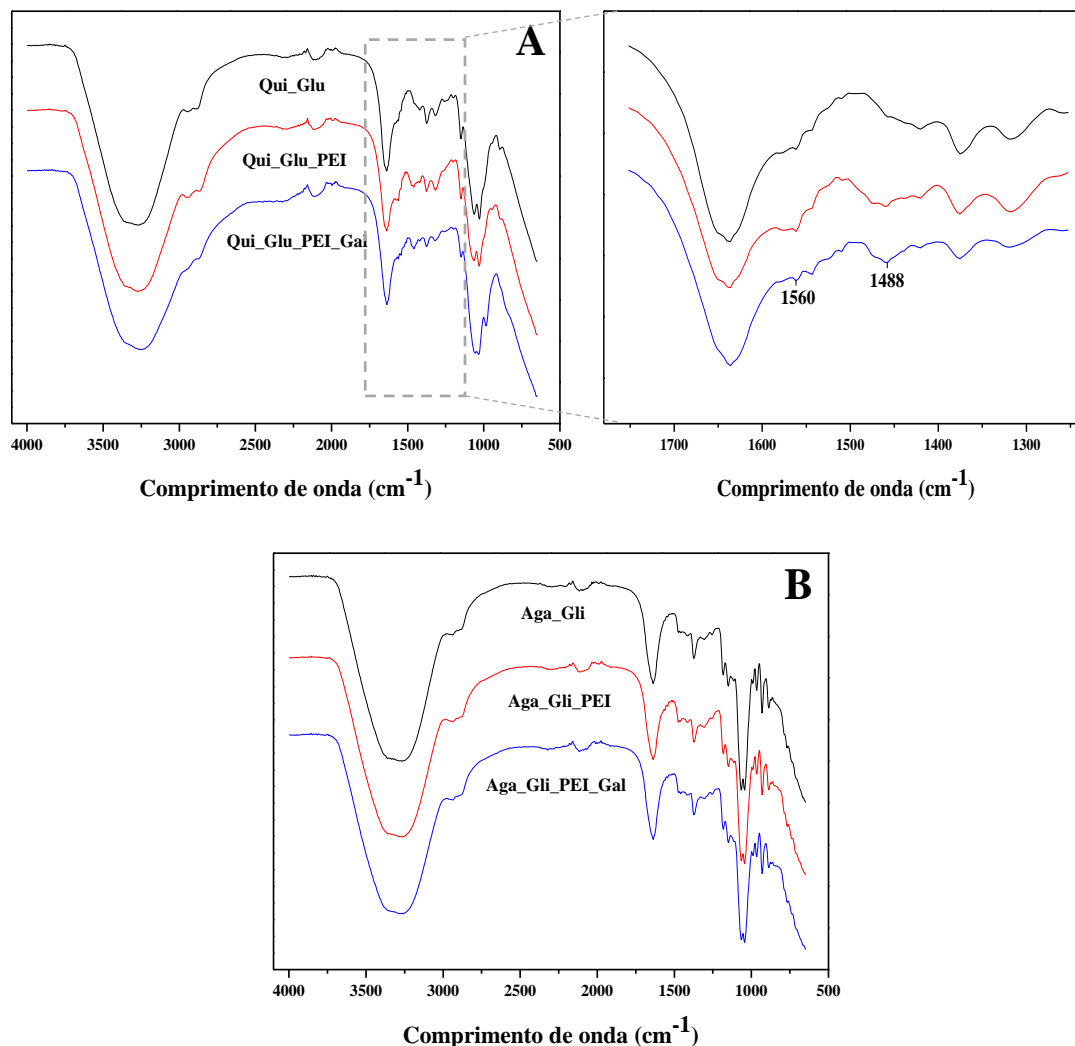
Figura 5 - Imobilização da β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* em: quitosana ativada com glutaraldeído (A) e quitosana ativada com glutaraldeído e revestida com PEI (B)



Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

Uma caracterização dos suportes foi realizada por Espectrofotometria no Infravermelho com Transformada de Fourier e a Figura 6 apresenta os espectros de FTIR dos suportes avaliados no presente estudo.

Figura 6 – Espectros de FTIR dos suportes e biocatalisadores de (A) quitosana e (B) agarose



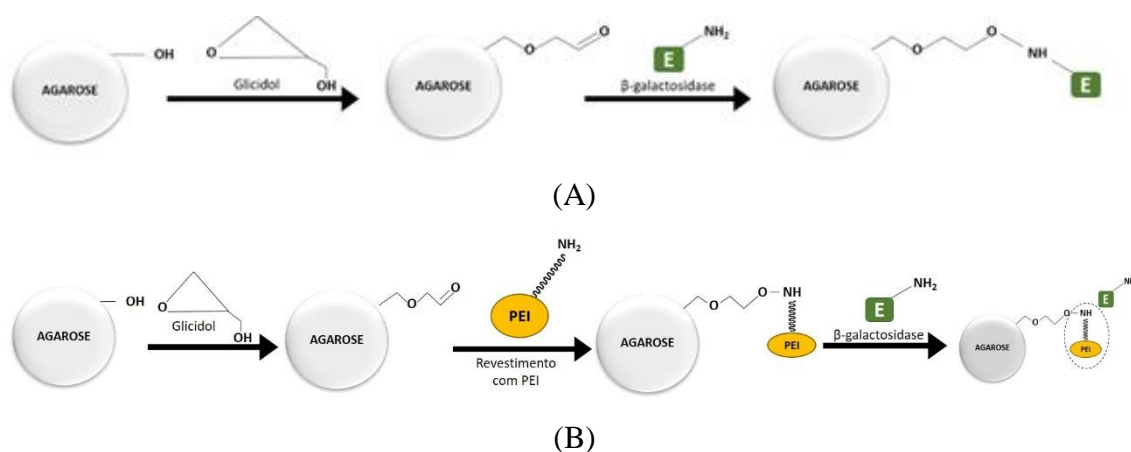
Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

Na Fig. 6-A, observa-se para o suporte de quitosana ativada com glutaraldeído as seguintes bandas: 1321 cm^{-1} , 1260 cm^{-1} e 1379 cm^{-1} , que correspondem às vibrações de dobramento das aminas, e $3570\text{-}3200\text{ cm}^{-1}$ referente aos grupamentos hidroxila. Ao se revestir esse suporte com PEI, observa-se a presença de um pico mais acentuado na banda de 1488 cm^{-1} e 1560 cm^{-1} , correspondentes a absorção vibração flexível da ligação CN. O mesmo pico é observado para o biocatalisador Qui_Glu_PEI_Gal, confirmando assim a presença do PEI nessas duas preparações. No entanto, comprovou-se que a caracterização dos suportes por FTIR não é uma boa técnica para verificar a presença do PEI, devido aos grupamentos do suporte e do polímero serem semelhantes, por exemplo, grupos aminas primária, secundária e terciária, e alguns estiramentos CH_2 . Para a agarose

ativada com glioxil não observou diferença nos espectros sem e com revestimento (Fig. 6-B).

Ao contrário da quitosana, a agarose possui apenas um grupo hidroxila disponível para formar ligações covalentes (Fig. 7-A). Assim, a ativação do suporte é necessária para ocorrer uma imobilização eficiente. O uso de glicidol na ativação da agarose permite a formação de grupos aldeídos capazes de formar bases de Schiff com grupos amino (MATEO et al., 2005). Apesar de haver apenas um grupo hidroxila disponível para interação, o sistema glioxil-agarose pode proporcionar uma imobilização covalente multiponto, se o tempo de incubação for prolongado, gerando biocatalisadores estáveis com ligações aminas secundárias (MATEO et al., 2006; HUERTA et al., 2011). Além disso, estudos de Bickerstaff e Bickerstaff, 2003; Mateo et al., 2005; Grazu et al., 2006 reportam que o suporte glioxil-agarose é mais eficiente em pH alcalino, uma vez que a imobilização é via bases reversíveis de Schiff, exigindo a formação de duas ligações simultâneas e os grupos lisina da enzima se tornam mais reativos nessas faixas de pH. No entanto, no presente estudo utilizou-se tampão a pH 7,0, e a esse pH as lisinas só possuem os grupos amino terminal expostos para reagir com o suporte ativado com glicidol, através de ligação “unipontual” (Fig. 4-B) (MATEO et. al., 2007; ADRIANO, 2008), o que pode ter conduzido a resultados inferiores dos parâmetros de imobilização para os suportes de agarose. Para a β -galactosidase, faixas de pH neutro são mais favoráveis a enzima e, conseqüentemente, tendem a diminuir o rendimento da imobilização em glioxil-agarose, exigindo uma alternativa para a otimização do processo: o revestimento do suporte com PEI (Fig. 7-B).

Figura 7 - Imobilização da β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* em: agarose ativada com glicidol (A) e agarose ativada com glicidol e revestida com PEI (B)



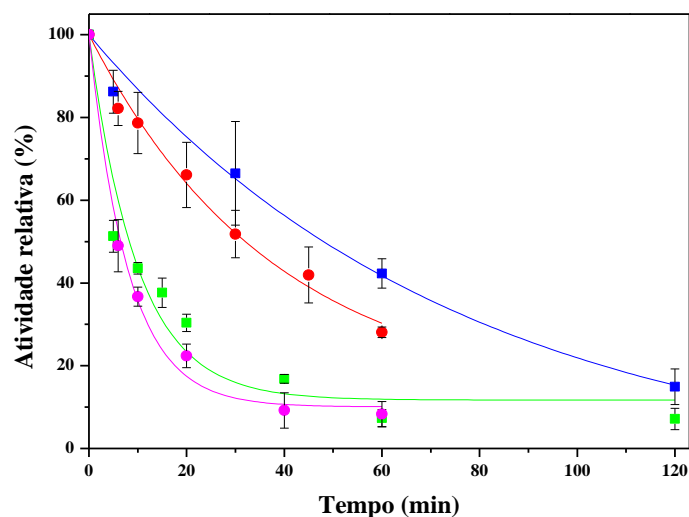
Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

Outro parâmetro importante a ser avaliado é a estabilização da enzima pela imobilização. A Figura 8 mostra os perfis de desativação em pH 6,6 e 50 °C, que é a temperatura usada na produção de alguns prebióticos, como a lactulose, e a Tabela 2 apresenta os parâmetros de desativação obtidos pelo modelo proposto por Sadana e Henley (SADANA E HENLEY, 1987). As meias-vidas dos suportes não revestidos foram maiores (mais de 5 vezes) quando comparadas aos suportes revestidos. As duas preparações covalentes (Qui_Glu_Gal e Aga_Gli_Gal) foram mais estáveis do que as de troca iônica (Qui_Glu_PEI_Gal e Aga_Gli_PEI_Gal). Esses resultados mostram que possivelmente a enzima estava ligada em sua maior parte por adsorção interfacial e por isso se mostrou menos estável nos suportes revestidos com PEI (Qui_Glu_PEI e Aga_Gli_PEI), ocorrendo assim poucas ligações covalentes entre a enzima e os demais grupos funcionais de suporte.

Os biocatalisadores Qui_Glu_Gal e Aga_Gli_Gal apresentaram tempos de meia-vida de $47,35 \pm 7,53$ min e $31,96 \pm 4,41$ min, respectivamente. Estudos conduzidos por Bernal et al. (2013) utilizando a β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* imobilizada em agarose ativada com brometo de cianogênio apresentou meia-vida de 35 min, a 50 °C e pH 7,0, resultado semelhante ao obtido no presente estudo para a mesma enzima imobilizada em agarose ativada com glicidol e utilizando temperatura semelhante. Já Giacomini et al. (1998) relataram uma redução de aproximadamente 70% da atividade da β -galactosidase de mesma cepa microbiana e imobilizada em sílica CPC ativada com

glutaraldeído 2,3% e CDAP-agarose, a 50 °C durante 30 min. Portanto, as preparações covalentes (Qui_Glu_Gal e Aga_Gli_Gal) avaliadas apresentaram tempos de meia-vida satisfatórios quando comparados a estudos onde se utilizaram à enzima de mesma origem e cuja estabilidade térmica foi avaliada em condições semelhantes. O modelo de Sadana e Henley se ajustou bem aos dados experimentais, como podemos observar na Tabela 2.

Figura 8 – Estabilidade térmica dos diferentes biocatalisadores de β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* a 50 °C, pH 6,6 em tampão fosfato de potássio 50 mM, contendo 0,1 mM de $MnCl_2$. (■) Qui_Glu; (■) Qui_Glu_PEI; (●) Aga_Gli; (●) Aga_Gli_PEI. As curvas representam o modelo de Sadana e Henley



Fonte: Elaborado pelo autor (2019).

Tabela 2 - Parâmetros de desativação e meia-vida dos biocatalisadores a pH 6,6 e 50 °C obtidos usando o modelo de Sadana e Henley. Letras diferentes representam diferenças estatísticas em um nível de confiança de 95% ($p < 0,05$)

Biocatalisador	K_d (min^{-1})	α	R^2	$t_{1/2}$ (min)
Qui_Glu_Gal	0,01315	0,00100	0,99	$47,35 \pm 7,53^a$
Qui_Glu_PEI_Gal	0,10122	0,11705	0,94	$8,27 \pm 0,79^b$
Aga_Gli_Gal	0,02628	0,12111	0,99	$31,96 \pm 4,41^a$
Aga_Gli_PEI_Gal	0,12489	0,10051	0,99	$6,53 \pm 0,81^b$

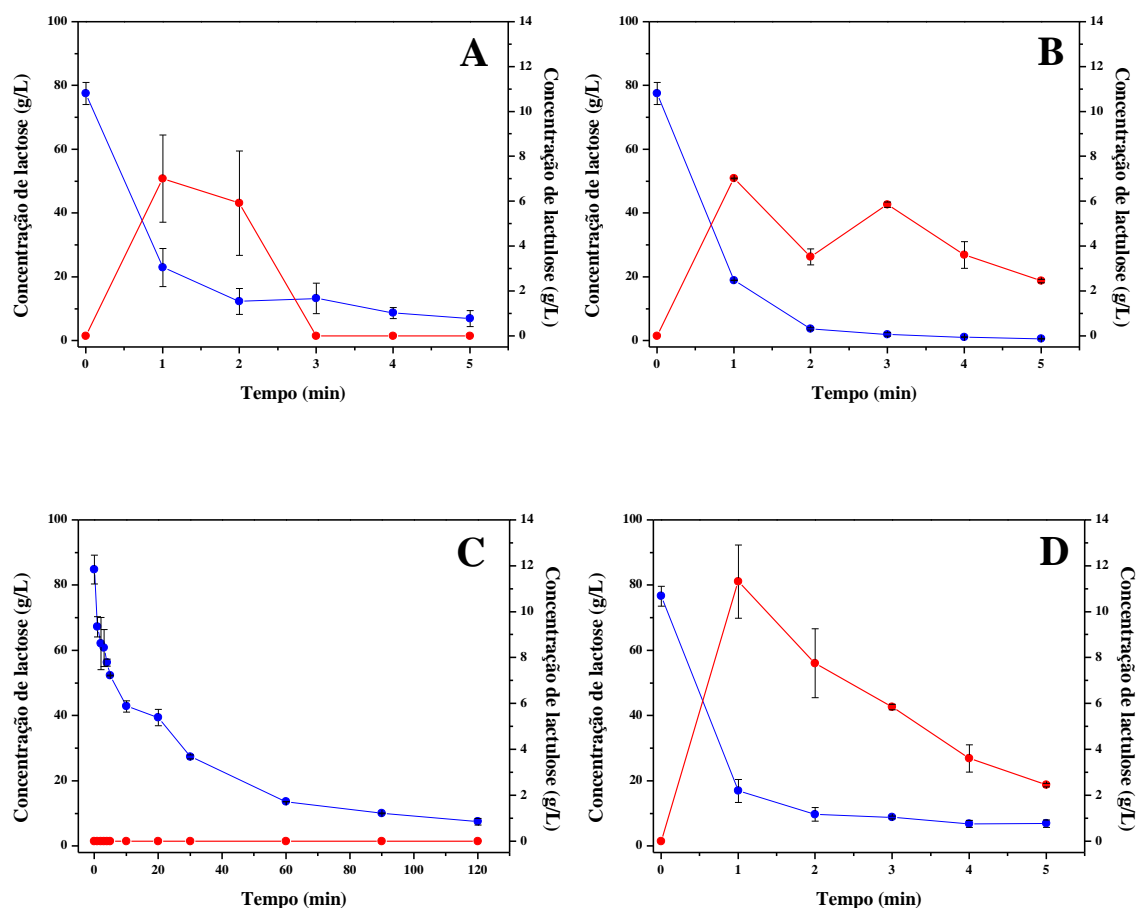
Fonte: Elaborado pelo autor (2019).

5.2 Eficiência catalítica dos biocatalisadores na hidrólise de lactose e produção de lactulose

A Figura 9 mostra os perfis de concentração de lactose e lactulose obtidos nos processos catalisados por cada biocatalisador avaliado. Os biocatalisadores Qui_Glu_Gal, Qui_Glu_PEI_Gal e Aga_Gli_PEI_Gal (Fig. 9-A, B e D) apresentaram excelente desempenho na hidrólise da lactose, obtendo mais de 90% de conversão aos cinco minutos de reação. A produção de lactulose, no entanto, foi maior nos primeiros minutos de reação e sua concentração foi diminuindo, possivelmente devido à reversibilidade da reação de transgalactosilação ou devido à formação de oligossacarídeos à base de lactulose (LuGOS).

Por outro lado, a hidrólise da lactose foi mais lenta ao usar o biocatalisador Aga_Gli_Gal (Fig. 9-C). Nos primeiros cinco minutos de reação, a conversão de lactose foi de apenas $38,29 \pm 3,34\%$ para esse biocatalisador. Além disso, a produção de lactulose não foi observada em nenhum tempo de reação avaliado. Possivelmente o sítio ativo responsável pela reação de transgalactosilação se tornou inacessível aos substratos, ou pode ter ocorrido uma alteração conformacional na estrutura enzimática, devido ao método de imobilização utilizado (JORDAN, 1996; ADLERCREUTZ, 2013; DICOSIMO et al., 2013; LIESE E HILTERHAUS, 2013; SECUNDO, 2013).

Figura 9 – Hidrólise de lactose e produção de lactulose pela enzima β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* immobilizada em: (A) quitosana ativada com glutaraldeído; (B) quitosana ativada com glutaraldeído e revestida com PEI; (C) agarose ativada com glicidol; (D) agarose ativada com glicidol e revestida com PEI. Condições reacionais: razão de massa de 1:2 lactose/frutose, concentração total de substrato de 200 g/L, 50 °C, pH 7, 4 U/mL e 120 rpm. Concentrações de lactose (●) e lactulose (●)



Fonte: Elaborado pelo autor (2019).

A Tabela 3 apresenta os valores de produção máxima, produtividade e rendimento da produção de lactulose e hidrólise da lactose. O uso do PEI para revestir os suportes de quitosana não representou uma melhora significativa nos parâmetros avaliados, com exceção da conversão de lactose, que aumentou de $94,09 \pm 0,40\%$ para $99,62 \pm 0,01\%$ para o suporte sem e com revestimento, respectivamente. Por outro lado, o revestimento do suporte de agarose provocou um aumento em todos os parâmetros avaliados no

processo de produção de lactulose. Estudos conduzidos por Aburto et al. (2020) relatam rendimentos de lactulose (Y_{LU}) de 0,344 para a β -galactosidase de *Bacillus circulans* imobilizada em glioxil-agarose, utilizando-se condições reacionais similares (50 °C, pH 7,0 e 100 mM) e razão molar lactose/frutose duas vezes menor. Esse mesmo suporte foi utilizado no presente estudo, no entanto não se observou a produção de lactulose em nenhum tempo avaliado. A diferença na origem da β -galactosidase pode justificar esse resultado. Já os demais biocatalisadores avaliados apresentaram rendimentos próximos ao do estudo mencionado, e o biocatalisador de agarose que recebeu o revestimento com PEI teve aproximadamente o dobro de rendimento de lactulose ($67 \pm 0,04\%$), mostrando mais uma vez a eficácia do revestimento dos suportes.

Tabela 3 - Desempenho dos biocatalisadores de *Kluyveromyces lactis* na hidrólise da lactose e produção de lactulose usando lactose PA como substrato. Condições reacionais: razão de massa de 1:2 lactose/frutose, concentração total de substrato de 200 g/L, 50 °C, pH 7 e 4 U/mL. Letras diferentes representam diferenças estatísticas em um nível de confiança de 95% ($p < 0,05$)

Biocatalisador	Conversão de lactose (%)	Rendimento	Produção	Produtividade (mg/(L.h))
		de lactulose (GLU/GLA) (%)	máxima de lactulose (g/L)	
Qui_Glu_Gal	94,09 \pm 0,40 ^a	30 \pm 0,07 ^a	7,01 \pm 1,95 ^a	420,61 \pm 116,83 ^a
Qui_Glu_PEI_Gal	99,62 \pm 0,01 ^b	37 \pm 0,01 ^a	7,02 \pm 0,02 ^a	421,20 \pm 0,95 ^a
Aga_Gli_Gal	91,17 \pm 0,70 ^c	-	-	-
Aga_Gli_PEI_Gal	92,19 \pm 0,58 ^c	67 \pm 0,04 ^b	11,31 \pm 1,60 ^b	678,70 \pm 95,86 ^b

Fonte: Elaborado pelo autor (2019).

A β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* é uma enzima tetramérica, composta por dois dímeros de subunidades idênticas (FERNANDEZ-LAFUENTE, 2009; PEREIRA-RODRÍGUEZ et al., 2012). Portanto, o uso de PEI nesse tipo de enzima estabiliza o biocatalisador obtido, otimizando o processo de imobilização enzimática e,

consequentemente, o processo de produção de lactulose. Isso pode ser explicado devido ao fato do polímero auxiliar no espaçamento entre a enzima e o suporte, aumentando a superfície de contato da enzima com o substrato e otimizando a reação (PEREIRA-RODRÍGUEZ et al., 2012). Além disso, o uso desse polímero pode ter causado alterações na conformação enzimática que deixaram o sítio ativo mais exposto, minimizando os possíveis efeitos difusivos causados pelo tamanho da molécula do substrato. Sabe-se que essa enzima possui uma inserção única no loop 420-443 (pertencente ao domínio 3, em seu sítio ativo), o que favorece a atividade hidrolítica por atuar como elo da lactose (VERA et al., 2011). Provavelmente, as alterações conformacionais causadas pelo revestimento de PEI no suporte devem ser causadas por mudanças nessa alça e, portanto, favoreceram a reação de transgalactosilação.

Albuquerque et al. (2018) relataram uma produção máxima de concentração de lactulose de 17,3 g/L para a β -galactosidase imobilizada em quitosana ativada com glutaraldeído. No entanto, a carga enzimática utilizada foi de 7 U/mL, enquanto no presente estudo a carga utilizada foi de 4 U/mL. Nesta mesma pesquisa, eles avaliaram a melhor carga enzimática para a síntese de lactulose e, utilizando 4 U/mL, foram obtidos 10,8 g/L de lactulose.

O uso de PEI no revestimento do suporte Qui_Glu não mostrou melhora notável na produção de lactulose. No entanto, o revestimento do suporte Aga_Gli melhorou consideravelmente o desempenho do biocatalisador obtido, acarretando na produção de $11,31 \pm 1,60$ g/L de lactulose. Esse mesmo biocatalisador cujo suporte não foi revestido não produziu o prebiótico. Esse resultado mostra que o uso de PEI no processo de imobilização melhorou a síntese de lactulose.

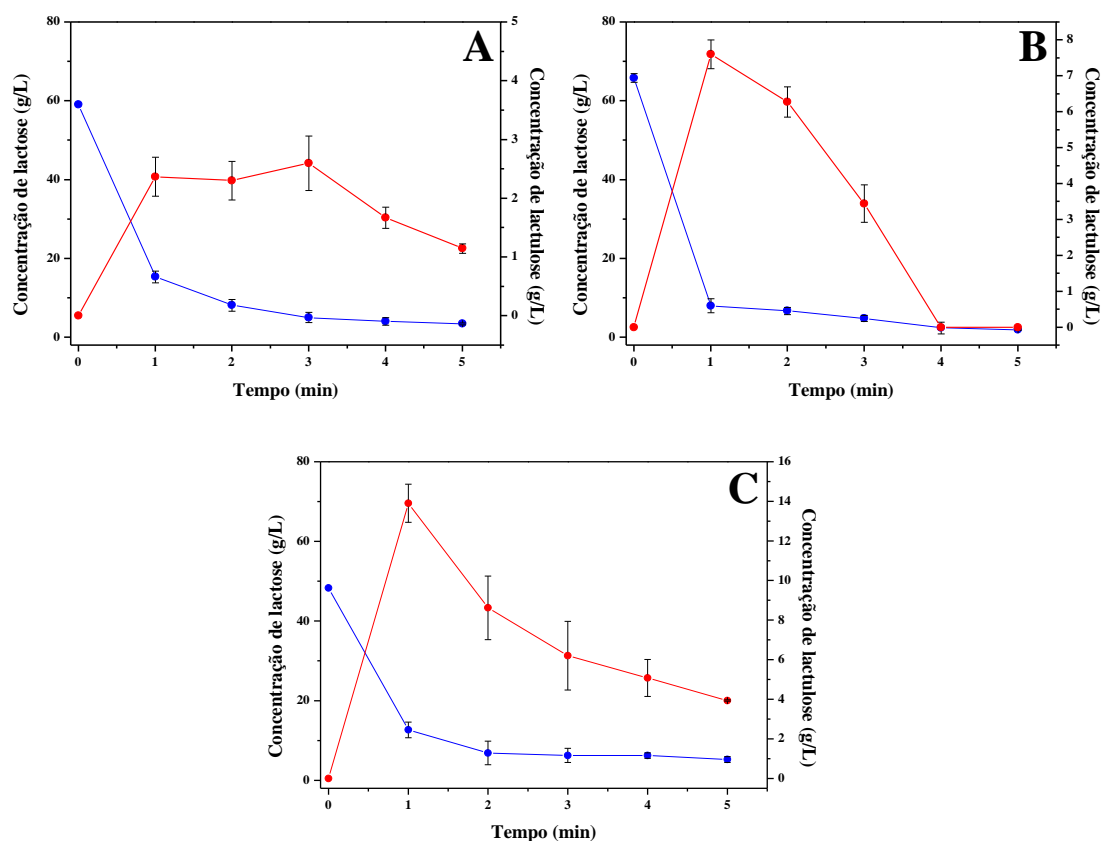
5.3 Avaliação da produção enzimática de lactulose utilizando soro de leite como matéria-prima e estabilidade operacional de biocatalisadores

A síntese de lactulose pelos biocatalisadores mais promissores obtidos foi investigada, sendo eles o Qui_Glu_Gal, Qui_Glu_PEI_Gal e Aga_Gli_PEI_Gal, e utilizando o soro de leite como matéria-prima. Já o biocatalisador Aga_Gli_Gal não foi utilizado nesse estudo pois não produziu lactulose utilizando solução de lactose sintética como substrato. A cinética dessas reações é apresentada na Figura 10.

Para o biocatalisador Qui_Glu_Gal, $94,03 \pm 1,50\%$ de lactose foi hidrolisada aos 5 min de reação, apresentando uma concentração residual de $3,44 \pm 0,22$ g/L. A produção

máxima de lactulose foi de $2,6 \pm 0,47$ g/L no mesmo intervalo de tempo. Aga_Gli_PEI_Gal teve uma conversão mais baixa: $88,92 \pm 1,69\%$ da lactose foi hidrolisada no mesmo tempo de reação, obtendo-se uma concentração residual de $5,24 \pm 0,73$ g/L. No entanto, a produção de lactulose foi 5 vezes maior, com uma concentração máxima de $13,90 \pm 0,96$ g/L, no mesmo intervalo de tempo (5 min). Isso mostra que, ao se usar o soro de leite como matéria-prima, a concentração de lactulose foi maior do que quando se usou o meio sintético contendo lactose. Segundo as especificações técnicas do fabricante, 100 g de soro continha aproximadamente: carboidratos (74 g); proteínas (11 g); gorduras totais (1g); gorduras saturadas (0,5 g); colesterol (6,0 mg), dentre outros compostos como sais, etc. Estudos reportados por Zolnere et al. (2017) apontam que as proteínas presentes no soro de leite podem envolver a enzima β -galactosidase e protegê-la contra perda de atividade, o que pode justificar a maior produção de lactulose ao se utilizar esse substrato. Os resultados obtidos nesse estudo mostram que o uso desse resíduo industrial para a produção de prebióticos é promissor.

Figura 10 – Hidrólise de lactose e produção de lactulose usando soro de leite como substrato para: (A) biocatalisador Qui_Glu_Gal; (B) biocatalisador Qui_Glu_PEI_Gal; (C) biocatalisador Aga_Gli_PEI_Gal. Condições reacionais: razão de massa de 1:2 lactose/frutose, concentração total de substrato de 200 g/L, 50 °C, pH 7, 4 U/mL e 120 rpm. (●) concentrações de lactose e (●) lactulose



Fonte: Elaborado pelo autor (2019).

A partir da análise da Fig. 10, observa-se uma redução da concentração de lactulose após 1 min de reação para os biocatalisadores que tiveram os suportes revestidos com PEI (Qui_Glu_PEI_Gal e Aga_Gli_PEI_Gal), e nesse mesmo tempo obteve-se $7,60 \pm 0,4$ g/L e $13,90 \pm 0,96$ g/L de lactulose, respectivamente.

O mecanismo da reação de transgalactosilação pode ser dividido em duas etapas: na primeira, há a formação do complexo β -galactosil (e aqui ocorre a liberação de glicose) e, em seguida, a transferência da fração de galactose no complexo para um aceitador de galactose, que pode ser um grupo hidroxila (água ou algum carboidrato presente no meio). A β -galactosidase não é tão específica sobre o receptor de galactose, que pode ser alguns dos carboidratos envolvidos na reação (lactose ou frutose) ou até a própria lactulose

formada, gerando o Lu-GOS. Assim, após atingir o valor máximo, a concentração de lactulose tende a diminuir possivelmente devido à hidrólise e formação de Lu-GOS (VERA et al., 2011; GUERRERO et al., 2011, 2015).

Outra explicação para esse comportamento pode ser devido à origem da enzima. Nesse sentido, a origem da enzima tende a determinar seu potencial de transgalactosilação e sua capacidade de usar moléculas diferentes como receptores de galactose. Estudos mostram que as β -galactosidases de *Kuyveromyces lactis* tendem a favorecer o processo de hidrólise (VERA et al., 2011; GUERRERO et al., 2015), sendo esse comportamento observado na Figura 10.

As Figuras 11-A e 11-B apresentam os resultados das concentrações de lactulose no estudo de estabilidade operacional dos biocatalisadores sintetizados usando lactose PA e soro de leite como um dos substratos, respectivamente. Os catalisadores obtiveram comportamentos distintos e a estabilidade foi diferente variando o substrato. A enzima β -galactosidase imobilizada em quitosana ativada com glutaraldeído foi estável durante os dez ciclos avaliados usando lactose PA como substrato, porém usando o soro de leite não se observou produção do prebiótico a partir do quinto ciclo, apesar de ocorrer a hidrólise da lactose (Figura 12-B). Com o reuso, devido a alguns compostos presentes no soro, tais como os sais de Na e Ca, ocorreu perda da atividade catalítica de transgalactosilação. A enzima imobilizada neste mesmo suporte, porém, revestido com PEI, apresenta o mesmo comportamento, mas as concentrações de lactulose produzidas nos ciclos foram superiores.

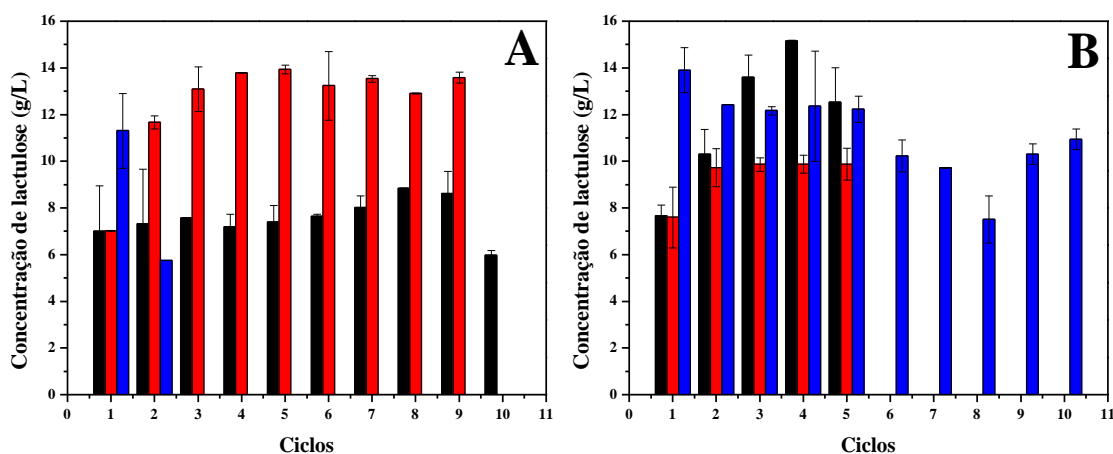
Os resultados obtidos com a enzima imobilizada no suporte agarose se mostraram complexos, pois o biocatalisador foi estável para a produção de lactulose usando o soro de leite como substrato (Fig. 11-B), mas na reação com lactose PA não produziu este dissacarídeo a partir do terceiro ciclo (Fig. 11-A). Salienta-se que este biocatalisador foi estável durante a hidrólise da lactose em ambos os substratos avaliados (Figs. 12-A e 12-B). Uma explicação possível seria as interações que ocorrem entre a enzima e o substrato e que a presença de alguns íons, ou compostos, do soro de leite podem ter intensificado esta interação, mantendo a enzima com sua atividade de transgalactosilação. Este biocatalisador demonstrou ser mais estável que o reportado por Albuquerque et al. (2018), que foi capaz de converter altas taxas de lactose a lactulose após 6 ciclos de reuso e nas mesmas condições utilizadas no presente estudo, e por Wu et al. (2017), que alcançou uma conversão de 42,4% de lactose em lactulose após 10 ciclos reacionais, utilizando a

enzima celobiose2-epimerase de *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* em um reator de membranas para produzi-la a partir de soro de leite.

Também é observado um reduzido aumento na produção do prebiótico entre o primeiro e segundo ciclos. Provavelmente devido à enzima ter sido submetida a presença do substrato na primeira reação e esse contato inicial com o substrato pode ter auxiliado numa melhor conformação da enzima para a reação de interesse.

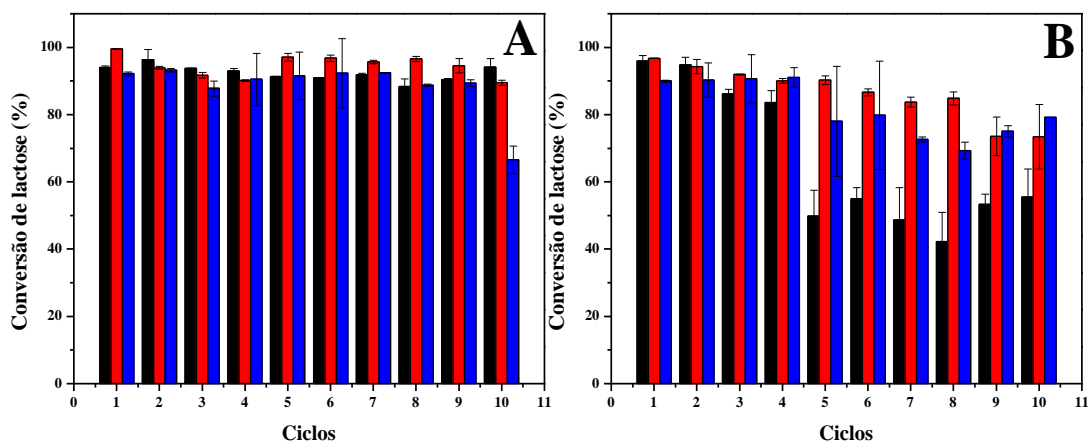
De uma forma geral, observa-se que os biocatalisadores obtidos com o suporte revestido com o PEI foram mais estáveis que aqueles sem revestimento. Estes resultados reforçam o que é citado na literatura sobre as vantagens do uso deste polímero no processo de imobilização de enzimas. Vários estudos relataram um aumento na estabilização de enzimas multiméricas com o processo de imobilização utilizando PEI, sendo as β -galactosidases de *Aspergillus oryzae* e de *Kluyveromyces lactis* exemplos desse grupo de enzimas (BLANCO et al., 1989; GIANFREDA E SCARFI, 1991; FERNÁNDEZ-LAFUENTE et al., 1999; PESSELA et al., 2003, 2005A; GARCIA-GALAN et al., 2013; HENRIQUES et al., 2018; SOUZA et al., 2018), além de que o PEI pode proporcionar uma maior estabilidade e, conseqüentemente, uma maior possibilidade de reuso desses biocatalisadores por vários ciclos reacionais (VELASCO-LOZANO; BENÍTEZ-MATEOS; LÓPEZ-GALLEGO, 2017).

Figura 11 – Concentrações de lactulose obtidas durante o estudo da estabilidade operacional dos derivados enzimáticos em catálise de solução sintética de lactose (A) e soro de leite (B). Condições reacionais: razão de massa de 1:2 lactose/frutose, concentração total de substrato de 200 g/L, 50 °C, pH 7, 50 mM, 4 U/mL e 120 rpm. Barras pretas: biocatalisador Qui_Glu_Gal; Barras vermelhas: biocatalisador Qui_Glu_PEI_Gal; Barras azuis: biocatalisador Aga_Gli_PEI_Gal



Fonte: Elaborado pelo autor (2019).

Figura 12 – Conversões de lactose obtidas durante o estudo da estabilidade operacional dos derivados enzimáticos em catálise de solução sintética de lactose (A) e soro de leite (B). Condições reacionais: razão de massa de 1:2 lactose/frutose, concentração total de substrato de 200 g/L, 50 °C, pH 7, 50 mM, 4 U/mL e 120 rpm. Barras pretas: biocatalisador Qui_Glu_Gal; Barras vermelhas: biocatalisador Qui_Glu_PEI_Gal; Barras azuis: biocatalisador Aga_Gli_PEI_Gal



Fonte: Elaborado pelo autor (2019).

6 CONCLUSÃO

A estratégia de revestimento dos suportes com PEI se mostrou eficaz para a imobilização da β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis*, melhorando consideravelmente os parâmetros de imobilização, bem como as reações catalisadas pela enzima. O biocatalisador obtido a partir da imobilização da enzima em suporte de quitosana ativada com glutaraldeído e revestida com PEI (Qui_Glu_PEI_Gal) mostrou maior eficiência na reação de hidrólise, apresentando $99,62 \pm 0,01\%$ de conversão de lactose. Para a síntese de lactulose, o biocatalisador obtido a partir da imobilização da enzima em suporte de agarose ativada com glicidol e revestida com PEI (Aga_Gli_PEI_Gal) foi mais eficaz, com uma produção máxima de lactulose de $11,31 \pm 1,60$ g/L.

Os biocatalisadores obtidos com os suportes revestidos com o PEI apresentaram uma maior estabilidade operacional e observou-se que a estabilidade depende do substrato utilizado, no caso, lactose PA ou soro de leite. Além disso, notou-se uma menor perda da atividade hidrolítica quando comparada a atividade de transgalactosilação com o reuso da enzima. Os biocatalisadores Qui_Glu_PEI_Gal e Aga_Gli_PEI_Gal são promissores para a obtenção de produtos com baixo teor de lactose, podendo ser reutilizados por pelo menos 10 ciclos, bem como, o catalisador Aga_Gli_PEI_Gal pode ser utilizado para a produção de lactulose. No entanto, são necessários estudos mais aprofundados sobre a estabilidade térmica desses biocatalisadores.

O uso do soro de leite como matéria-prima para a produção de lactulose é uma alternativa industrialmente vantajosa, além de reduzir o impacto ambiental causado pelo descarte direto desse resíduo no meio ambiente.

REFERÊNCIAS

ABURTO, C.; GUERRERO, C.; VERA, C.; ILLANES, A. Improvement in the yield and selectivity of lactulose synthesis with *Bacillus circulans* β -galactosidase. **Lwt**, v. 118, p.108746-108752, 2020.

ADRIANO, W. S. **Preparação e Caracterização de Derivados de Enzimas Industriais em Quitosana**. 2008. 161 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2008.

AIDER, M.; HALLEUX, D. DE. Isomerization of lactose and lactulose production: review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 18, n. 7, p. 356–364, 2007.

AÏT-AISSA, A.; AÏDER, M. Lactulose: production and use in functional food, medical and pharmaceutical applications. Practical and critical review. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 49, n. 5, p. 1245–1253, 2014.

ALBUQUERQUE, T. L. **Produção enzimática de lactulose a partir de soro de leite utilizando a enzima B-galactosidase de *Kluyveromyces lactis***. 2018. 159 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia Química, Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2018.

ALBUQUERQUE, T. L.; GOMES, S. D. L.; D'ALMEIDA, A. P.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; GONÇALVES, L. R. B.; ROCHA, M. V. P. Immobilization of β -galactosidase in glutaraldehyde-chitosan and its application to the synthesis of lactulose using cheese whey as feedstock. **Process Biochemistry**, v. 73, p.65-73, 2018.

ANDERSSON, M. M.; BRECCIA, J. D.; HATTI-KAUL, R. Stabilizing effect of chemical additives against oxidation of lactate dehydrogenase. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 32, n. 3, p. 145, 2000.

ANDERSSON, M. M.; HATTI-KAUL, R. Protein stabilising effect of polyethyleneimine. **Journal of Biotechnology**, v. 72, n. 1–2, p. 21–31, 1999.

BECERRA, M.; BAROLI, B.; FADDA, A. M. MÉNDEZ, J. B.; SISO, M. I. G. Yeast β -galactosidase in solid-state fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 29, p. 506-512, 2001.

BERNAL, C.; MARCIELLO, M.; MESA, M.; SIERRA, L.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; MATEO, C.; GUISÁN, J.. Immobilisation and stabilisation of β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* using a glyoxyl support. **International Dairy Journal**, v. 28, n. 2, p.76-82, 2013.

BLANCO, R. M.; CALVETE, J. J.; GUISÁN, J. M. Immobilization-stabilization of enzymes; variables that control the intensity of the trypsin (amine)-agarose (aldehyde) multipoint attachment. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 11, n. 6, p. 353–359, 1989.

BOING, A.; DREWS, A.; KRAUME, M. Influences of operating conditions on continuous lactulose synthesis in an enzymatic membrane reactor system : A basis prior to long-term operation. **Journal of Biotechnology**, v. 203, p. 89–96, 2015.

BOLIVAR, J. M.; ROCHA-MARTIN, J.; MATEO, C.; CAVA, F.; BERENQUER, J.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; GUISÁN, J. M. Coating of soluble and immobilized enzymes with ionic polymers: Full stabilization of the quaternary structure of multimeric enzymes. **Biomacromolecules**, v. 10, n. 4, p. 742–747, 2009.

BÖTTCHER, D., BORNSCHEUER, U. T. Protein engineering of microbial enzymes. *Current Opinion in Microbiology*, v. 13, n. 3, p. 274 – 282, 2010.

BRADFORD, M. A Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p.248-254, 1976.

BRECCIA, J. D.; ANDERSSON, M. M.; HATTI-KAUL, R. The role of poly(ethyleneimine) in stabilization against metal-catalyzed oxidation of proteins: A case study with lactate dehydrogenase. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1570, n. 3, p. 165–173, 2002.

BUDRIENE, S.; GOROCHOVCEVA, N.; ROMASKEVIC, T.; YUGOVA, V. L.; MIEZELIENE, A.; DIENYS, G.; ZUBRIENE, A. β -galactosidase from *Penicillium canescens*. Properties and immobilization. **Central European Journal of Chemistry**, v.3, n.1, p.95-105. 2005.

CARDELLE-COBAS, A.; FERNÁNDEZ, M.; SALAZAR, N.; MARTÍNEZ-VILLALUENGA, C. Bifidogenic effect and stimulation of short chain fatty acid production in human faecal slurry cultures by oligosaccharides derived from lactose and lactulose. **Journal of Dairy Research**, v. 76, n. 3, p. 317–325, 2009.

CHIBATA, I. Immobilised Enzymes—Research and Development, John Wiley and Sons, Inc., New York, USA, 1978.

COLANTONIO, A. G.; WERNER, S. L.; BROWN, M. The effects of prebiotics and substances with prebiotic properties on metabolic and inflammatory biomarkers in individuals with type 2 diabetes mellitus: A systematic review. **Journal Of The Academy Of Nutrition And Dietetics**, p.1-23, 2019.

DICOSIMO, R., MCAULIFFE, J., POULOSE, A.J. AND BOHLMANN, G. Industrial Use of Immobilized Enzymes. *Chemical Society Reviews*, v. 42, p. 6437 – 6474, 2013.

DONKOR, O. N.; NILMINI, S. L. I.; STOLIC, P.; VASIJEVIC, T.; SHAH, N. P. Survival and activity of selected probiotic organisms in set-type yoghurt during cold storage. **International Dairy Journal**, v. 17, n. 6, p. 657–665, 2007.

FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; RODRÍGUEZ, V.; MATEO, C.; PENZOL, G.; HERNÁNDEZ-JUSTIZ, O.; IRAZOQUI, G.; VILLARINO, A.; OVSEJEVI, K.; BATISTA, F.; GUISÁN, J. M. Stabilization of multimeric enzymes via immobilization and post-immobilization techniques. **Journal of Molecular Catalysis - B Enzymatic**,

v. 7, n. 1–4, p. 181–189, 1999.

GARCIA-GALAN, C.; BARBOSA, O.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Stabilization of the hexameric glutamate dehydrogenase from *Escherichia coli* by cations and polyethyleneimine. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 52, n. 4–5, p. 211–217, 2013.

GIANFREDA, L.; SCARFI, M. R. Enzyme stabilization: state of the art. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 100, n. 2, p. 97–128, 1991.

GIACOMINI, C.; VILLARINO, A.; FRANCO-FRAGUAS, L.; BATISTA-VIEIRA, F.. Immobilization of β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* on silica and agarose: comparison of different methods. **Journal Of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 4, n. 5-6, p.313-327, 1998.

GUERRERO, C.; VERA, C.; ARAYA, E.; CONEJEROS, R.; ILLANES, A. Repeated-batch operation for the synthesis of lactulose with β -galactosidase immobilized by aggregation and crosslinking. **Bioresource Technology**, v. 190, p. 122–131, 2015.

GUERRERO, C.; CARLOS, V.; NESTOR, S.; ILLANES, A. Immobilization of *Aspergillus oryzae* β -galactosidase in an agarose matrix functionalized by four different methods and application to the synthesis of lactulose. **Bioresource Technology**, v. 232, p. 53–63, 2017.

GIBSON, G. R. Prebiotics as Gut Microflora Management Tools. **Journal Of Clinical Gastroenterology**, v. 42, n. 2, p.75-79, 2008.

GUINANE, C. M.; COTTER, P. D. Role of the gut microbiota in health and chronic gastrointestinal disease: understanding a hidden metabolic organ. **Therapeutic Advances In Gastroenterology**, v. 6, n. 4, p.295-308, 2013.

GUISÁN, J. M. Aldehyde-agarose gels as activated supports for immobilization-stabilization of enzymes. **Enzyme Microb. Technol.** 10, 375–382, 1988.

HEANEY, R. P. Dairy intake, dietary adequacy, and lactose intolerance. **Advances In Nutrition**, v. 4, n. 2, p.151-156, 2013.

HOSPEDALES, C. J.; JANÉ-LLOPIS, E. A multistakeholder platform to promote health and prevent noncommunicable diseases in the region of the americas: The pan american health organization partners forum for action. **Journal Of Health Communication**, v. 16, n. 2, p.191-200, 2011.

HUEBNER, J.; WEHLING, R. L.; HUTKINS, R. W.; Functional activity of commercial prebiotics. **International Dairy Journal**, v. 17, n. 7, p.770-775, 2007.

KACZMARCZYK, M. M.; MILLER, M. J.; FREUND, G. G.. The health benefits of dietary fiber: Beyond the usual suspects of type 2 diabetes mellitus, cardiovascular disease and colon cancer. **Metabolism**, v. 61, n. 8, p.1058-1066, 2012.

KIM, Y. S.; OH, D. K. Lactulose production from lactose as a single substrate by a

- thermostable cellobiose 2-epimerase from *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*. **Bioresource Technology**, v. 104, p. 668–672, 2012.
- KIM, Y. S.; PARK, C. S.; OH, D. K. Lactulose production from lactose and fructose by a thermostable β -galactosidase from *Sulfolobus solfataricus*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 4, p. 903–908, 2006.
- KLIBANOV, A. M. Immobilized enzymes and cells as practical catalysts. **Science**, v. 219, n. 4585, p. 722–727, 1983.
- KUMAR, A.; GALAEV, I. Y.; MATTIASSON, B. Polymer displacement/shielding in protein chromatography. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 741, n. 2, p. 103–113, 2000.
- LADERO, M.; SANTOS, A.; GARCÍA-OCHOA, F. Kinetic modeling of lactose hydrolysis with an immobilized β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, p. 583–592, 2000.
- L., D. et al. 第7回心筋会 演題 Review 2010/7/3 東邦大学大橋病院（当番世話人：鈴木真事先生）. v. 148, p. 1–7, 2010.
- LIMA, A. F.; CAVALCANTE, K. F.; FREITAS, M. F. M.; RODRIGUES, T. H. S.; ROCHA, M. V. P.; GONÇALVES, L. R. B. Comparative biochemical characterization of soluble and chitosan immobilized β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* NRRL Y1564. **Process Biochemistry (1991)**, v. 48, p. 443–452, 2013.
- LUCIA MONTI. Lactose, galactose and glucose determination in naturally “lactose free” hard cheese: : HPAEC-PAD method validation. **Food Chemistry**, v. 220, p. 18–24, 2017.
- LÜTZ, S. Biocatalysts and Enzyme Technology. 2nd Edition. By Klaus Buchholz, Volker Kasche and Uwe Theo Bornscheuer. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 52, n. 28, p. 7073–7073, 2013.
- MACKENZIE, A. K.; NAAS, A. E.; KRACUN, S. K.; SCHUCKEL, J.; FANGEK, J. U.; AGGER, J. W.; WILLATS, W. G. T.; EIJSINK, V. G. H.; POPE, P. B. A polysaccharide utilization locus from an uncultured Bacteroidetes phylotype suggests ecological adaptation and substrate versatility. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, n. 1, p. 187–195, 2015.
- MANO, J.; NSHITSUJI, Y.; KIKUCHI, Y.; FUKUDOME, S.; HAYASHIDA, T.; KAWAKAMI, H.; KURIMOTO, Y.; NOGUCHI, A.; KONDO, K.; TESHIMA, R.; TAKABATAKE, R.; KITTA, K. Quantification of DNA fragmentation in processed foods using real-time PCR. **Food Chemistry**, v. 226, p. 149–155, 2017.
- MATEO, C.; ABIAN, O.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; GUISÁN, J. M. Increase in conformational stability of enzymes immobilized on epoxy-activated supports by favoring additional multipoint covalent attachment. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, n. 7, p. 509–515, 2000a.

MATEO, C.; ABIAN, O.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; GUISÁN, J. M. Reversible enzyme immobilization via a very strong and nondistorting ionic adsorption on support-polyethylenimine composites. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 68, n. 1, p. 98–105, 2000b.

MATEO, C.; PALOMO, J. M.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; GUISA, J. M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzymes and Microbial Technology**, v. 40, n. 6, p. 1451-1463, 2007.

MAYER, J.; KRANZ, B.; FISCHER, L. Continuous production of lactulose by immobilized thermostable β -glycosidase from *Pyrococcus furiosus*. **Journal of Biotechnology**, v. 145, n. 4, p. 387–393, 2010.

MESSIA, M. C.; CANDIGLIOTA, T.; MARCONI, E. Assessment of quality and technological characterization of lactose-hydrolyzed milk. **Food Chemistry**, v. 104, n. 3, p.910-917, 2007.

MOHANTY, D.; MISRA, S.; MOHAPATRA, S.; SAHU, P. Prebiotics and synbiotics: Recent concepts in nutrition. **Food Bioscience**, v. 26, p.152-160, 2018.

NOOSHKAM, M.; BABAZADEH, A.; JOOYANDEH, H. Lactulose: Properties, techno-functional food applications, and food grade delivery system. **Trends in Food Science and Technology**, v. 80, n. July, p. 23–34, 2018.

NOOSHKAM, M.; MADADLOU, A. Microwave-assisted isomerisation of lactose to lactulose and Maillard conjugation of lactulose and lactose with whey proteins and peptides. **Food Chemistry**, v. 200, p. 1–9, 2016.

NGUYEN, V. D.; STYEVKÓ, G.; MADARAS, E.; HAKTANIRLAR, G.; TRAN, A. T. M.; BUJNA, E.; DAM, M. S.; NGUYEN, Q. D. Immobilization of β -galactosidase on chitosan-coated magnetic nanoparticles and its application for synthesis of lactulose-based galactooligosaccharides. **Process Biochemistry**, v. 84, p.30-38, 2019.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Relatório de status global sobre DNTs**. Disponível em: <http://www.who.int/nmh/publications/ncd_report_full_en.pdf>. Acesso em: 12 dez. 2019.

OLIVETO, Paloma. **Obesidade é segunda principal causa de morte no mundo**. 2018. Disponível em: <https://www.correiobraziliense.com.br/app/noticia/ciencia-e-saude/2018/05/13/interna_ciencia_saude,680303/obesidade-e-segunda-principal-causa-de-morte-no-mundo.shtml>. Acesso em: 15 maio 2018.

PANESAR, P. S.; KUMARI, S. Lactulose: Production, purification and potential applications. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 6, p. 940–948, 2011.

PESELA, B. C. C.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; FUENTES, M.; VIÁN, A.; GARCIA, J. L.; CARRASCOSA, A. V.; MATEO, C.; GUISÁN, J. M. Reversible immobilization of a thermophilic β -galactosidase via ionic adsorption on PEI-coated Sepabeads. **Enzyme And Microbial Technology**, v. 32, n. 3-4, p.369-374, 2003.

- PESSELA, B. C. C.; BETANCOR, L.; LOPEZ-GALLEGO, F.; TORRES, R.; DELLAMORA-ORTIZ, G. M.; ALONSO-MORALES, N.; FUENTES, M.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; GUISÁN, J. M.; MATEO, C. Increasing the binding strength of proteins to PEI coated supports by immobilizing at high ionic strength. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 37, n. 3, p. 295–299, 2005.
- PESSELA, B. C. C.; DELLAMORA-ORTIZ, G.; BETANCOR, L.; FUENTES, M.; GUISÁN, J. M.; FERNÁNDEZ-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, n. 2, p.310-315, 2007.
- PETUELY, F. Bifidusflora bei Flaschenkindern durch bifidogene Substanzen (Bifidusfaktor). **Zeitschrift für Kinderheilkunde**, v. 79, n. 2, p. 174–179, 1957.
- POLLARD, D. J.; WOODLEY, J. M. Biocatalysis for pharmaceutical intermediates: the future is now. **Trends in Biotechnology**, v. 25, n. 2, p. 66–73, 2007.
- REJIKUMAR, S.; DEVI, S. Int Hydrolysis of lactose and milk whey using a fixedbed reactor containing β -galactosidase covalently bound onto chitosan and crosslinked poly (vinyl alcohol). **International Journal Food Science Technology**, v.36, p. 91-98, 2001.
- ROSEVEAR, A. Immobilised Biocatalysts-a Critical Review. **J. Chem. Tech. Biotechnol**, v. 34, n. Figure 1, p. 127–150, 1984.
- ROYER, G. P. Immobilized Enzymes Catalysis Reviews, 1978. **Catalysis Reviews**, v. 22, n. 1, p. 29–73, 1980.
- ISHWARYA, S. P.; PRABHASANKAR, P. Prebiotics: Application in Bakery and Pasta Products. **Critical Reviews In Food Science And Nutrition**, v. 54, n. 4, p.511-522, 2013.
- SANTOS, R.; SIMIQUELI, A. P. R.; PASTORE, G. M. Produção de galactooligossacarídeo por *Scopulariopsis sp.* **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 3, n. 29, p.1-9, 2009.
- SAKO, T.; MATSUMOTO, K.; TANAKA, R.. Recent progress on research and applications of non-digestible galacto-oligosaccharides. **International Dairy Journal**, v. 9, n. 1, p.69-80, 1999.
- SCHMIDT, A.; SIVARAMAN, J.; LI, Y.; LAROCQUE, R.; BARBOSA, J. A. R. G.; SMITH, C.; MATTE, A.; SCHRAG, J. D.; CYGLER, M. Three-Dimensional Structure of 2-Amino-3-ketobutyrate CoA Ligase from *Escherichia coli* Complexed with a PLP–Substrate Intermediate: inferred reaction mechanism. **Biochemistry**, v. 40, n. 17, p. 5151-5160, 2001.
- SCHMIDT, C. M.; BALINGER, F.; CONRAD, J.; GUNTHER, J.; BEIFUSS, U.; HINRICHS, J. Enzymatic generation of lactulose in sweet and acid whey: Optimization of feed composition and structural elucidation of 1-lactulose. **Food Chemistry**, v. 305, p.125481-125487, 2020.

SCHOEMAKER, H. E.; MINK, D.; WUBBOLTS, M. G. Dispelling the myths--biocatalysis in industrial synthesis. **Science**, v. 299, n. 5613, p. 1694–1697, 2003.

SCHUMANN, C. Medical, nutritional and technological properties of lactulose. An update. **European Journal of Nutrition**, v. 41, n. 0, p. 1–1, 2002.

SCHUSTER-WOLFF-BÜHRING, R.; FISCHER, L.; HINRICHS, J. Production and physiological action of the disaccharide lactulose. **International Dairy Journal**, v. 20, n. 11, p. 731–741, 2010.

SCIENTIFIC, E. Dairy Research Foundation, Inc. v. 82, p. 393–397, 1980.

SEKI, N.; SAITO, H. Lactose as a source for lactulose and other functional lactose derivatives. **International Dairy Journal**, v. 22, n. 2, p. 110–115, 2012.

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

SILVA, J. A.; MACEDO, G. P.; RODRIGUES, D. S.; GIORDANO, R. L. C.; GONÇALVES, L. R. B. Immobilization of *Candida antarctica* lipase B by covalent attachment on chitosan-based hydrogels using different support activation strategies. **Biochemical Engineering Journal**, v. 60, p.16-24, 2012.

SILVÉRIO, S. C.; MACEDO, E. A.; TEIXEIRA, J. A.; RODRIGUES, L. R. Biocatalytic Approaches Using Lactulose: end product compared with substrate. **Comprehensive Reviews In Food Science And Food Safety**, v. 15, n. 5, p. 878-896, 2016.

SLAVIN, J. Fiber and Prebiotics: Mechanisms and Health Benefits. **Nutrients**, v. 5, n. 4, p.1417-1435, 2013.

SUEBSIRI, N.; KOKILAKANISTHA, P.; LAOJARUWAT, T.; TUMPANUVATR, T.; JITTANIT, W. The application of ohmic heating in lactose-free milk pasteurization in comparison with conventional heating, the metal contamination and the ice cream products. **Journal Of Food Engineering**, v. 262, p.39-48, 2019.

SURI, S.; KUMAR, V.; PRASAD, R.; TANWAR, B.; GOYAL, A.; KAUR, S.; GAT, Y.; KUMAR, A.; KAUR, J.; SINGH, D. Considerations for development of lactose-free food. **Journal Of Nutrition & Intermediary Metabolism**, v. 15, p.27-34, 2019.

Compared with Substrate. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 15, n. 5, p. 878–896, 2016.

SONG, Y. S.; LEE, H. U.; PARK, C.; KIM, S. W. Batch and continuous synthesis of lactulose from whey lactose by immobilized β -galactosidase. **Food Chemistry**, v. 136, n. 2, p. 689–694, 2013.

TORRES, R.; PESSELA, B. C. C.; FUENTES, M.; MATEO, C.; MUNILLA, R.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; GUISÁN, J. M. Supports coated with PEI as a new

tool in chromatography. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 4, p. 711-716--, 2006.

VAHERI, M.; KAUPPINEN, V. The formation of lactulose (4-O- β galactopyranosylfructose) by β -galactosidase. *Acta Pharm Fennicae*, v. 87, p. 7583, 1978.

VELASCO-LOZANO, S.; BENÍTEZ-MATEOS, A. I.; LÓPEZ-GALLEGO, F. Co-immobilized phosphorylated cofactors and enzymes as self-sufficient heterogeneous biocatalysts for chemical processes. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 56, n. 3, p. 771–775, 2017.

VIEIRA, D. C. **Imobilização da Enzima β -galactosidase de *Kluyveromyces fragilis* em agarose e quitosana utilizando diferentes protocolos de ativação**. 2009. 96 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2009.

VIRGEN-ORTÍZ, J. J.; DOS SANTOS, J. C. S.; BERENGUER-MURCIA, N.; BARBOSA, O.; RODRIGUES, R. C.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Polyethylenimine: A very useful ionic polymer in the design of immobilized enzyme biocatalysts. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 5, n. 36, p. 7461–7490, 2017.

WAHLQVIST, M. L. Lactose nutrition in lactase nonpersisters. **Asia Pacific Journal Of Clinical Nutrition**. Ásia, p. 21-25. 2015.

WANG, H.; YANG, R.; HUA, X.; ZHAO, W.; ZHANG, W. Enzymatic production of lactulose and 1-lactulose: Current state and perspectives. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 14, p. 6167–6180, 2013.

WEAVER, L. E.; CARTA, G. Protein adsorption on cation exchangers: Comparison of macroporous and gel-composite media. **Biotechnology Progress**, v. 12, n. 3, p. 342–355, 1996.

WOODLEY, J. M. New opportunities for biocatalysis: making pharmaceutical processes greener. **Trends in Biotechnology**, v. 26, n. 6, p. 321–327, 2008.

WU, L.; XU, C.; LI, S.; LIANG, J.; XU, H.; XU, Z. Efficient production of lactulose from whey powder by cellobiose 2-epimerase in an enzymatic membrane reactor. **Bioresource Technology**, v. 233, p.305-312, 2017.

ZAAK, H.; PEIRCE, SARA; ALBUQUERQUE, T. L.; SASSI, M.; FERNANDEZLAFUENTE, R. Exploiting the Versatility of Aminated Supports Activated with Glutaraldehyde to Immob. Catalysts, v. 7, p. 1-14, 2017.

ZOLNERE, K.; LIEPINS, J.; CIPROVICA, I. The impact of calcium ions on commercially available β -galactosidase. **Foodbalt**, p.27-30, 2017.

ZOKAEE, F.; KAGHAZCHI, T.; ZARE, A.; SOLEIMANI, M. Isomerization of lactose to lactulose - Study and comparison of three catalytic systems. **Process Biochemistry**, v. 37, n. 6, p. 629–635, 2002.