



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

**NATAN CÂMARA GOMES E SILVA**

**APRIMORAMENTO DAS CONDIÇÕES OPERACIONAIS PARA A SÍNTESE DE  
OLIGOSSACARÍDEOS POR  $\beta$ -GALACTOSIDASE DE *Kluyveromyces lactis* A  
PARTIR DE SORO DE LEITE**

**FORTALEZA**

**2021**

NATAN CÂMARA GOMES E SILVA

APRIMORAMENTO DAS CONDIÇÕES OPERACIONAIS PARA A SÍNTESE DE  
OLIGOSSACARÍDEOS POR  $\beta$ -GALACTOSIDASE DE *Kluyveromyces lactis* A PARTIR  
DE SORO DE LEITE

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

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Maria Valderez Ponte Rocha

Coorientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Luciana Rocha Barros Gonçalves

FORTALEZA

2021

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)

---

- S581a Silva, Natan Câmara Gomes e.  
Aprimoramento das condições operacionais para a síntese de oligossacarídeos por B-galactosidase de *Kluyveromyces lactis* a partir de soro de leite / Natan Câmara Gomes e Silva. – 2021.  
188 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Fortaleza, 2021.  
Orientação: Profa. Dra. Maria Valderéz Ponte Rocha.  
Coorientação: Profa. Dra. Luciana Rocha Barros Gonçalves.
1. Oligossacarídeos. 2. Lactulose. 3. Soro de Leite. 4. B-galactosidase. 5. *Kluyveromyces lactis*. I. Título.  
CDD 660
-

NATAN CÂMARA GOMES E SILVA

APRIMORAMENTO DAS CONDIÇÕES OPERACIONAIS PARA A SÍNTESE DE  
OLIGOSSACARÍDEOS POR  $\beta$ -GALACTOSIDASE DE *Kluyveromyces lactis* A PARTIR  
DE SORO DE LEITE

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

Aprovada em: 13/08/2021.

BANCA EXAMINADORA

---

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Maria Valdevez Ponte Rocha (Presidente)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. James Almada da Silva (Membro Externo)  
Universidade Federal de Sergipe (UFS)

---

Prof. Dr. Adriano Aguiar Mendes (Membro Externo)  
Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG)

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cleide Maria Farias Soares (Membro Externo)  
Universidade Tiradentes (UNIT-SE)

---

Dr. Tiago Lima de Albuquerque (Membro Externo)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

*À Dona Eneildes e à Dona  
Maria.*

*Aos meus pais, Carlos Alberto e  
Maria Vanderlea, e aos meus irmãos,  
Saulo e Mariana.*

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, mais uma vez agradeço a Deus por me permitir chegar até aqui. Sem Sua misericórdia nunca teria chegado tão longe e hoje posso ver o quanto cada processo vivido foi importante para o meu amadurecimento profissional e espiritual. Nesse momento faltam palavras, mas Deus sabe do sentimento de gratidão que toma conta do meu coração. Obrigado, Pai!

Aos meus pais, Carlos Alberto da Silva e Maria Vanderlea Câmara da Silva, por todo empenho e dedicação para que eu conseguisse chegar até aqui. Hoje, mais do que nunca, tenho noção de todos os sacrifícios feitos para que essa etapa da vida pudesse ser finalizada. Vou sempre dar o meu melhor para poder retribuir da forma que vocês merecem toda essa dedicação e todos os ensinamentos dados ao longo da minha vida. Obrigado por tudo! Amo vocês!

Aos meus irmãos, Saulo Câmara Gomes e Silva e Mariana Câmara Gomes e Silva, por serem exemplos de companheirismo e cumplicidade. Sei que sempre poderei contar com vocês.

À toda minha família por todo incentivo e apoio dado.

À minha Professora, amiga e conselheira, Maria Valdevez Ponte Rocha. Não tenho palavras para expressar minha gratidão à senhora. Agradeço por todos os ensinamentos e por todos os puxões de orelha. Obrigado pela paciência e pelas vezes que precisei conversar sobre coisas que me deixavam triste. Obrigado pelas vezes que a senhora soube me acalmar e mostrar que tudo ia acabar bem. Meu muito obrigado.

Aos meus amigos de longa data, Sara Isamelita, Ennio Targino e Talhyta Ferreira, por todos os momentos de descontração necessários para que eu pudesse recarregar as baterias e voltar mais empenhado para conclusão desse trabalho.

Ao amigo Júnior Oliveira por todas as viagens feitas e por torná-las mais descontraídas e animadas. Sem dúvida alguma as idas e vindas à Fortaleza se tornaram mais suaves e confortáveis. Obrigado, meu amigo!

Ao GPBio por todo apoio e por toda caminhada juntos.

À Universidade Federal do Ceará.

À vida pelas oportunidades.

*“Seja forte e corajoso! Não se apavore, nem desanime, pois o Senhor, o seu Deus, estará com você por onde andar.”*

***Josué 1:9***

## RESUMO

Alimentos funcionais podem ser definidos como compostos benéficos ao organismo humano e que podem atuar na prevenção de determinadas doenças crônicas. Um dos principais compostos, são os oligossacarídeos, destacando-se a lactulose. Esse composto possui características benéficas ao organismo humano, contribuindo para o tratamento e a prevenção de doenças relacionadas ao trato gastrointestinal. Já existem formas de obtenção a partir de vias bioquímicas, que possibilitam o uso de substratos não puros, como por exemplo, subprodutos ou resíduos industriais, encaixando-se aqui o soro de leite, o qual é um subproduto da indústria de laticínios com baixo custo e alto potencial para o uso nesse tipo de processo. Neste contexto, o presente estudo objetivou avaliar diferentes condições operacionais para aprimorar a produção de oligossacarídeos por  $\beta$ -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* imobilizada em quitosana, utilizando o soro de leite como substrato. A imobilização enzimática em quitosana foi feita seguindo um protocolo de ativação com glutaraldeído 0,8 % (v/v). Os resultados mostraram que a melhor carga de proteína usada na imobilização foi de 7 mg/g, obtendo-se um biocatalisador com atividade de  $44,29 \pm 0,95$  U/g. Também se determinou a atividade de transgalactosilação da enzima, a qual foi de  $56.837 \pm 487,32$  U<sub>lactulose</sub>/g<sub>enzima</sub>. Na produção da lactulose e/ou de oligossacarídeos, com reagentes puros, avaliou-se o efeito da razão inicial de substrato lactose:frutose e a melhor proporção avaliada foi de 1:2, para ambas as formas do catalisador, livre ou imobilizada. O percentual de hidrólise da lactose foi de 96,02 % e 97,86 %; 15,51 g/L e 13,20 g/L de lactulose produzida e um rendimento de produção de lactulose de 0,20 e 0,21 g<sub>lactulose</sub>/g<sub>lactose</sub>, usando enzima livre e imobilizada, respectivamente. Os estudos com soro de leite mostraram que os melhores resultados foram obtidos também na razão de 1:2 de lactose:frutose. Os percentuais de hidrólise foram de 95,39 % e 96,56 %; 20,77 g/L e 9,01 g/L de lactulose produzida com rendimentos de 0,33 e 0,14 g<sub>lactulose</sub>/g<sub>lactose</sub>, respectivamente nos estudos com enzima livre e imobilizada. Além desses estudos, foram realizados processos que envolveram a incubação prévia do biocatalisador à temperatura de reação e na presença dos componentes do meio reacional. Uma prévia incubação do biocatalisador à temperatura de 50 °C foi positiva para o processo quando foram utilizadas temperaturas inferiores à ótima na reação, ocorrendo um aumento de 40,74 % e de 26 % na produção de lactulose quando o processo foi conduzido a 25 °C e 37 °C, respectivamente. Em relação à incubação enzimática em meios com os substratos, houve uma melhora nos níveis de lactulose produzida à 25 °C, quando o biocatalisador foi incubado em tampão e em lactose. Estabelecidas as melhores condições, buscou-se uma proposta de integração de processos, utilizando-se diferentes configurações operacionais e outros biocatalisadores, como a glicose-isomerase de *S. murinus*. Utilizou-se reatores batelada, seguindo diferentes esquemas reacionais. Os resultados mostraram-se inferiores ao esperado, mas ainda assim foram produzidos oligossacarídeos, como a lactulose (1,24 g/L) e a rafinose (3,16 g/L). As etapas de hidrólise foram eficientes, indicando a necessidade de se partir para novas estratégias operacionais, a fim de se otimizar a integração dos processos. Assim, estudos iniciais em reatores de leito fixo (utilizando reagentes puros) foram realizados e os percentuais hidrolíticos obtidos nos processos contínuos foram de 96%, com uma produção de glicose e de galactose de 41,64 e 42,14 g/L, respectivamente, obtidas após o processo entrar no estado estacionário, com poucas variações de concentração após 3,5 horas de reação no leito. Avaliou-se também o processo de isomerização da glicose liberada, por glicose-isomerase de *S. murinus*. Os estudos de isomerização em reator de leito fixo, usando glicose pura e soro de leite hidrolisado, também se mostraram eficientes, produzindo uma concentração de frutose de aproximadamente 46,13 g/L e 35,19 g/L, respectivamente, após entrada no estado estacionário. Além desses estudos, avaliou-se a redução da carga proteica no processo de imobilização, a fim de se reduzir efeitos de uma possível hidrólise reversa dos produtos formados, mostrando que essa redução melhorou os

níveis de produção da lactulose, bem como da rafinose. Os resultados obtidos indicam o início de um processo promissor para o uso de um subproduto industrial para obtenção de compostos com maior valor agregado.

**Palavras-chave:** Oligossacarídeos; Lactulose; Soro de leite;  $\beta$ -galactosidase; *Kluyveromyces lactis*; Imobilização enzimática.

## ABSTRACT

Functional foods can be defined as beneficial compounds to the human body and that can act in the prevention of certain chronic diseases. One of the main compounds are the oligosaccharides, especially lactulose. This compound has beneficial characteristics to the human body, contributing to the treatment and prevention of diseases related to the gastrointestinal tract. There are already ways of obtaining it from biochemical pathways, which allow the use of non-pure substrates, such as by-products or industrial waste, including whey, which is a low-cost by-product of the dairy industry and high potential for use in this type of process. In this context, the present study aimed to evaluate different operational conditions to improve the production of oligosaccharides by  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* immobilized on chitosan, using whey as a substrate. Enzymatic immobilization in chitosan was performed following an activation protocol with 0.8% glutaraldehyde (v/v). The results showed that the best load of protein used in the immobilization was 7 mg/g, resulting in a biocatalyst with an activity of  $44.29 \pm 0.95$  U/g. The transgalactosylation activity of the enzyme was also determined, which was  $56,837 \pm 487.32$  U<sub>lactulose</sub>/g<sub>enzyme</sub>. In the production of lactulose and/or oligosaccharides, with pure reagents, the effect of the initial substrate lactose:fructose ratio was evaluated and the best ratio evaluated was 1:2 for both forms of catalyst, free or immobilized. The percentage of lactose hydrolysis was 96.02% and 97.86%; 15.51 g/L and 13.20 g/L of lactulose produced and a lactulose production yield of 0.20 and 0.21 g<sub>lactulose</sub>/g<sub>lactose</sub>, using free and immobilized enzyme, respectively. The studies with whey showed that the best results were also obtained in the 1:2 ratio of lactose:fructose. The hydrolysis percentages were 95.39% and 96.56%; 20.77 g/L and 9.01 g/L of lactulose produced with yields of 0.33 and 0.14 g<sub>lactulose</sub>/g<sub>lactose</sub>, respectively in studies with free and immobilized enzymes. In addition to these studies, processes were carried out that involved the previous incubation of the biocatalyst at the reaction temperature and in the presence of the components of the reaction medium. A previous incubation of the biocatalyst at a temperature of 50°C was positive for the process when temperatures below the optimal reaction were used, with an increase of 40.74% and 26% in lactulose production when the process was conducted at 25°C and 37°C, respectively. Regarding the enzymatic incubation in media with the substrates, there was an improvement in the levels of lactulose produced at 25°C, when the biocatalyst was incubated in buffer and in lactose. Once the best conditions were established, a proposal for process integration was sought, using different operational configurations and other biocatalysts, such as glucose-isomerase from *S. murinus*. Batch reactors were used, following different reaction schemes. The results were lower than expected, but oligosaccharides were produced, such as lactulose (1.24 g/L) and raffinose (3.16 g/L). The hydrolysis steps were efficient, indicating the need to move to new operational strategies in order to optimize the integration of processes. Thus, initial studies in fixed bed reactors (using pure reagents) were carried out and the hydrolytic percentages obtained in the continuous processes were 96%, with a glucose and galactose production of 41.64 and 42.14 g/L, respectively, obtained after the process enters the steady state, with little variation in concentration after 3.5 hours of reaction in the bed. The process of isomerization of the released glucose by glucose-isomerase from *S. murinus* was also evaluated. The isomerization studies in a fixed-bed reactor, using pure glucose and hydrolyzed whey, were also efficient, producing a fructose concentration of approximately 46.13 g/L and 35.19 g/L, respectively, after entry into the stationary state. In addition to these studies, the reduction of protein load in the immobilization process was evaluated in order to reduce the effects of a possible reverse hydrolysis of the formed products, showing that this reduction improved the production levels of lactulose, as well as raffinose. The results obtained indicate the beginning of a promising process for the use of an industrial by-product to obtain compounds with greater added value.

**Key-words:** Oligosaccharides; Lactulose; Whey;  $\beta$ -galactosidase; *Kluyveromyces lactis*; Enzymatic immobilization.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Principais benefícios fisiológicos dos oligossacarídeos.....	36
Figura 2 – Estrutura molecular da lactulose. ....	44
Figura 3 – Esquema de hidrólise da lactose por rota enzimática, utilizando $\beta$ -galactosidases como biocatalisadores da reação. ....	45
Figura 4 – Aplicações da lactulose no setor farmacêutico e no setor alimentício.....	46
Figura 5 – Esquema de isomerização alcalina da lactose para formação de lactulose e outros subprodutos.....	49
Figura 6 – Reações de hidrólise da lactose e síntese de lactulose por transgalactosilação, catalisadas por $\beta$ -galactosidase.....	53
Figura 7 – Representação esquemática das diferentes reações que envolvem o complexo enzimático $\beta$ -galactosil com diferentes tipos de nucleófilos.....	55
Figura 8 – Estrutura molecular dos compostos envolvidos na formação da molécula de rafinose (A) e na molécula de estaquiose (B).....	57
Figura 9 – Estrutura dimensional de $\beta$ -galactosidases de (A) <i>Kluyveromyces lactis</i> e (B) <i>Aspergillus niger</i> .....	60
Figura 10 – Destinação do leite inspecionado no mercado nacional durante o ano de 2019. ...	80
Figura 11 – Esquema operacional utilizado no processo integrado A. ....	93
Figura 12 – Esquema operacional utilizado no processo integrado B.....	94
Figura 13 – Esquema operacional para o processo de hidrólise do soro de leite em leito fixo, utilizando $\beta$ -galactosidase de <i>K. lactis</i> imobilizada em quitosana ativada com glutaraldeído 0,8 (v/v). ....	96
Figura 14 – Estruturas do glutaraldeído em solução aquosa. ....	101
Figura 15 – Efeito da razão lactose:frutose no processo de hidrólise da lactose e produção de lactulose por $\beta$ -galactosidase de <i>K. lactis</i> livre, utilizando lactose pura como substrato. Razão 1:1 (A); razão 1:2 (B); razão 1:3 (C); razão 2:1 (D) e razão 3:1 (E). Condições reacionais: concentração total de substrato = 200 g/L ( $\pm$ 10 g/L); tampão fosfato de potássio pH 7 e 50 mM; 50 °C; 120 RPM e 60 minutos. Lactose (■), glicose (●) e lactulose (▲).....	103
Figura 16 - Efeito da razão lactose:frutose no processo de hidrólise e produção de lactulose por $\beta$ -galactosidase de <i>K. lactis</i> imobilizada em quitosana ativada com glutaraldeído e utilizando lactose pura como substrato. Razão 1:1 (A); razão 1:2 (B); razão 1:3 (C); razão 2:1 (D) e razão 3:1 (E). Condições reacionais: concentração total de substrato	

= 200 g/L ( $\pm$  10 g/L); tampão fosfato de potássio pH 7 e 50 mM; 50 °C e 120 RPM.  
Lactose (■), glicose (●) e lactulose (▲)..... 107

Figura 17 – Comparativo entre os resultados obtidos no processo de hidrólise da lactose (A) e produção de lactulose (B) utilizando  $\beta$ -galactosidase de *K. lactis* livre (barra cinza escuro, ■) e imobilizada (barra cinza claro, ▒) em quitosana ativada com glutaraldeído, e lactose pura. Letras iguais representam que não houve diferença estatística significativa entre os parâmetros avaliados em um nível de confiança de 5 % (letras minúsculas para enzima livre e letras maiúsculas para enzima imobilizada). ..... 111

Figura 18 - Efeito da razão inicial de lactose:frutose no processo de hidrólise e produção de lactulose por  $\beta$ -galactosidase de *K. lactis* livre, utilizando soro de leite como substrato. Razão 1:1 (A); razão 1:2 (B); razão de 1:3 (C); razão de 2:1 (D) e razão de 3:1 (E). Condições reacionais: concentração total de substrato = 200 g/L ( $\pm$  10 g/L); tampão fosfato de potássio pH 7 e 50 mM; 50 °C e 120 RPM. Lactose (■), glicose (●) e lactulose (▲). ..... 114

Figura 19 - Efeito da razão inicial lactose:frutose no processo de hidrólise e produção de lactulose por  $\beta$ -galactosidase de *K. lactis* imobilizada em quitosana ativada com glutaraldeído e utilizando soro de leite como substrato. Razão 1:1 (A); razão 1:2 (B); razão 1:3 (C); razão 2:1 (D) e razão 3:1 (E). Condições reacionais: concentração total de substrato = 200 g/L ( $\pm$  10 g/L); tampão fosfato de potássio pH 7 e 50 mM; 50 °C e 120 RPM. Lactose (■), glicose (●) e lactulose (▲)..... 118

Figura 20 – Comparativo entre os resultados obtidos no processo de hidrólise da lactose (A) e produção de lactulose (B) utilizando  $\beta$ -galactosidase de *K. lactis* livre (barra cinza escuro, ■) e imobilizada (barra cinza claro, ▒) em quitosana ativada com glutaraldeído, e soro de leite como fonte de lactose. Letras iguais representam que não houve diferença estatística significativa entre os parâmetros avaliados em um nível de confiança de 5 % (letras minúsculas para enzima livre e letras maiúsculas para enzima imobilizada). ..... 121

Figura 21 –Influência da temperatura no processo de hidrólise da lactose e síntese de lactulose por  $\beta$ -galactosidase de *K. lactis* imobilizada em quitosana ativada com glutaraldeído. Condições reacionais: concentração total de substrato = 200 g/L ( $\pm$  10 g/L); tampão fosfato de potássio 50 mM e pH 7,0; 7 U/mL e 120 RPM por 20 minutos. .... 124

- Figura 22 – Perfis de concentração de lactose (A) e de lactulose (B) com a variação da temperatura: 25 °C (■); 37 °C (●) e 50 °C (▲). Condições reacionais: concentração total de substrato = 200 g/L ( $\pm$  10 g/L); tampão fosfato de potássio 50 mM e pH 7,0; 7 U/mL e 120 RPM por 10 min. .... 127
- Figura 23 – Estabilidade operacional da  $\beta$ -galactosidase de *K. lactis* imobilizada em quitosana ativada com glutaraldeído. Temperaturas avaliadas: 25 °C (■), 37 °C (■) e 50 °C (■). Percentuais de hidrólise de lactose (A) e concentração máxima de lactulose (B), obtidos por ciclo. Condições reacionais: concentração total de substrato = 200 g/L ( $\pm$  10 g/L); tampão fosfato de potássio 50 mM e pH 7,0; 7 U/mL e 120 RPM por 10 minutos..... 129
- Figura 24 – Influência da temperatura no processo de hidrólise da lactose e formação de lactulose por  $\beta$ -galactosidase de *K. lactis* imobilizada em quitosana ativada com glutaraldeído, após incubação prévia a 50 °C por 10 min. Condições reacionais: concentração total de substrato = 200 g/L ( $\pm$  10 g/L); tampão fosfato de potássio 50 mM e pH 7,0; 7 U/mL e 120 RPM por 10 minutos. .... 132
- Figura 25 – Estabilidade operacional da  $\beta$ -galactosidase de *K. lactis* imobilizada em quitosana ativada com glutaraldeído, após o processo de incubação a 50 °C por 10 minutos. Temperaturas avaliadas: 25 °C (■), 37 °C (■) e 50 °C (■). Percentuais de hidrólise de lactose (A) e concentração máxima de lactulose (B), obtidos por ciclo. Condições reacionais: concentração total de substrato = 200 g/L ( $\pm$  10 g/L); tampão fosfato de potássio 50 mM e pH 7,0; 7 U/mL e 120 RPM por 10 minutos. .... 134
- Figura 26 – Efeito da incubação do biocatalisador a 50 °C por 30 minutos em tampão fosfato de potássio (50 mM e pH 7,0), lactose (66,7 g/L) e frutose (133,3 g/L) na hidrólise da lactose (A) e produção de lactulose (B) por  $\beta$ -galactosidase de *K. lactis* imobilizada em quitosana ativada com glutaraldeído, a 25 °C (barra cinza escuro, ■) e 50 °C (barra cinza claro, ■). Condições reacionais: concentração total de substrato = 200 g/L ( $\pm$  10 g/L); tampão fosfato de potássio 50 mM e pH 7,0; 7 U/mL e 120 RPM por 10 minutos..... 137
- Figura 27 – Processo integrado A: avaliação da hidrólise do soro de leite por  $\beta$ -galactosidase de *K. lactis* imobilizada em quitosana ativada com glutaraldeído, seguida pela isomerização por glicose isomerase de *S. murinus* e, por fim, reação de transgalactosilação com o biocatalisador utilizado no início. Lactose (■); glicose (▲), galactose (▼), frutose (◀) e lactulose (●). Condições reacionais: [La]<sub>inicial</sub> =

66,7 g/L ( $\pm$  5 g/L); 7 U/mL; 50 °C; pH 7,0, 120 RPM e 20 minutos (reações com  $\beta$ -galactosidase);  $m_{enz} = 0,5$  g, pH 7,5, 70 °C, agitação mecânica suave por 90 min (reação com glicose isomerase)..... 141

Figura 28 - Processo integrado A, com suplementação de frutose: avaliação da hidrólise do soro de leite por  $\beta$ -galactosidase de *K. lactis* imobilizada em quitosana ativada com glutaraldeído, seguida pela isomerização por glicose isomerase de *S. murinus* e, por fim, reação de transgalactosilação com o biocatalisador utilizado no início. Lactose (■); glicose (▲), galactose (▼), frutose (◀) e lactulose (●). Condições reacionais: [La]<sub>inicial</sub> = 66,7 g/L ( $\pm$  5 g/L); 7 U/mL; 50 °C; pH 7,0, 120 RPM e 20 minutos (reações com  $\beta$ -galactosidase);  $m_{enz} = 0,5$  g, pH 7,5, 70 °C, agitação mecânica suave por 90 min (reação com glicose isomerase)..... 143

Figura 29 – Processo integrado B: avaliação da hidrólise do soro de leite por  $\beta$ -galactosidase de *K. lactis* imobilizada em quitosana ativada com glutaraldeído, simultaneamente com a isomerização, por glicose isomerase de *S. murinus* e, por fim, reação de transgalactosilação com o biocatalisador utilizado no início. Lactose (■); glicose (▲), galactose (▼), frutose (◀) e lactulose (●). Condições reacionais: [La]<sub>inicial</sub> = 66,7 g/L ( $\pm$  5 g/L); 7 U/mL; 50 °C; pH 7,0, 120 RPM e 20 minutos (reações com  $\beta$ -galactosidase);  $m_{enz} = 0,5$  g, pH 7,5, 70 °C, agitação mecânica suave por 90 minutos (reação com glicose isomerase)..... 145

Figura 30 – Processo integrado B, com suplementação de frutose: avaliação da hidrólise do soro de leite por  $\beta$ -galactosidase de *K. lactis* imobilizada em quitosana ativada com glutaraldeído, simultaneamente com a isomerização, por glicose isomerase de *S. murinus* e, por fim, reação de transgalactosilação com o biocatalisador utilizado no início. Lactose (■); glicose (▲), galactose (▼), frutose (◀) e lactulose (●). Condições reacionais: razão La:Fru = 1:2, concentração total de carboidratos = 200 g/L ( $\pm$  10 g/L), 7 U/mL; 50 °C; pH 7,0, 120 RPM e 20 minutos (reações com  $\beta$ -galactosidase);  $m_{enz} = 0,5$  g, pH 7,5, 70 °C, agitação mecânica suave por 90 minutos (reação com glicose isomerase)..... 147

Figura 31 – Processo integrado A: avaliação da hidrólise do soro de leite por  $\beta$ -galactosidase de *K. lactis* imobilizada em quitosana ativada com glutaraldeído, seguida pela isomerização por glicose isomerase de *S. murinus* e, por fim, reação de transgalactosilação com o biocatalisador virgem. Lactose (■); glicose (▲), galactose (▼), frutose (◀), lactulose (⊖), rafinose (⊕) e estaquiose (⊙). Condições

- reacionais:  $[La]_{\text{inicial}} = 66,7 \text{ g/L} (\pm 5 \text{ g/L})$ ; 7 U/mL; 50 °C; pH 7,0, 120 RPM e 20 minutos (reações com  $\beta$ -galactosidase);  $m_{\text{enz}} = 0,5 \text{ g}$ , pH 7,5, 70 °C, agitação mecânica suave por 90 min (reação com glicose isomerase)..... 149
- Figura 32 – Avaliação da redução da carga proteica utilizada na imobilização de  $\beta$ -galactosidase de *K. lactis* em quitosana ativada com glutaraldeído 0,8 % (v/v). Perfis de hidrólise da lactose (A), produção de lactulose (B) e rafinose (C). Cargas avaliadas: 7 mg/g (◆); 5,25 mg/g (▼); 3,5 mg/g (▲); 1,75 mg/g (●) e 0,7 mg/g (■). Condições reacionais: concentração total de açúcares = 200 g/L; tampão fosfato de potássio pH 7,0 e 100 mM, 120 RPM, 50 C e 30 minutos..... 152
- Figura 33 – Esquemas reacionais das etapas de hidrólise, transgalactosilação e hidrólise reversa catalisados por  $\beta$ -galactosidasas..... 154
- Figura 34 – Comparação entre os perfis de hidrólise da lactose (A), produção de estaquiiose (B), rafinose (C) e de lactulose (D) por  $\beta$ -galactosidasas de *Kluyveromyces lactis* (■) e de *Aspergillus oryzae* (●). Condições reacionais: concentração total de açúcares = 200 g/L ( $\pm 10 \text{ g/L}$ ); razão de La:Fru = 1:2; tampão fosfato de potássio pH 7,0 e 50 mM; 50 °C, 120 RPM e 150 minutos..... 155
- Figura 35 – Hidrólise do soro de leite por  $\beta$ -galactosidase de *K. lactis* imobilizada em reator de leito fixo. Condições reacionais:  $m_{\beta\text{-Gal}} = 2 \text{ g}$ ;  $h_L = 3 \text{ cm}$ ; Carga enzimática do leito = 80 U;  $\tau = 4,7 \text{ minutos}$ ;  $t = 10 \text{ horas}$ ;  $v = 0,5 \text{ mL/min}$ ; 50 °C e pH 7,0. Lactose (■); glicose (●) e galactose (▲)..... 157
- Figura 36 – Avaliação da isomerização da glicose pura (A) e da glicose presente no soro de leite hidrolisado (B) em reator de leito fixo recheado com glicose isomerase de *S. murinus*. Condições reacionais:  $m_{GI} = 1 \text{ g}$ ;  $h_L = 3 \text{ cm}$ ; carga enzimática global do leito = 350 U;  $\tau = 11,7 \text{ minutos}$ ;  $t = 5 \text{ horas}$ ;  $v = 0,2 \text{ mL/min}$ ; 70 °C e pH 7,0. Glicose (■) e frutose (●). ..... 159

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Principais prebióticos, suas estruturas moleculares e suas fontes de obtenção. ....	28
Tabela 2 – Principais processos de produção industrial de oligossacarídeos (continua). ....	38
Tabela 3 – Propriedades físico-químicas da lactulose.....	45
Tabela 4 – Fontes e formas de imobilização de $\beta$ -galactosidases mais recentes avaliadas na síntese de lactulose. ....	68
Tabela 5 – Fontes de $\beta$ -galactosidases e diferentes métodos e suportes usados para imobilização. ....	77
Tabela 6 – Composição média e características físico-químicas dos efluentes gerados nos processos industriais da indústria de laticínios. ....	81
Tabela 7 – Parâmetros de imobilização de $\beta$ -galactosidase de <i>Kluyveromyces lactis</i> em quitosana ativada com glutaraldeído 0,8% (v/v) obtidos no processo realizado a pH 7,0 e 25 °C em tampão fosfato de potássio 100 mM com $MnCl_2$ 0,1 mM e $MgCl_2$ 0,2 mM, sob agitação suave por 2 horas.....	98
Tabela 8 – Influência da variação na razão inicial lactose:frutose na reação de hidrólise da lactose e produção de lactulose, utilizando lactose pura e $\beta$ -galactosidase de <i>K. lactis</i> livre. Condições reacionais: concentração total de substrato = 200 g/L; tampão fosfato de potássio 50 mM e pH 7,0; 7 U/mL, 50 °C e 120 RPM por 10 minutos. Letras iguais representam que não houve diferença estatística significativa entre os parâmetros avaliados em um nível de confiança de 5 %. ....	105
Tabela 9 – Influência da variação na razão inicial lactose:frutose na reação de hidrólise da lactose e produção de lactulose, utilizando lactose pura e $\beta$ -galactosidase de <i>K. lactis</i> imobilizada em quitosana ativada com glutaraldeído. Condições reacionais: concentração total de substrato = 200 g/L ( $\pm$ 10 g/L); tampão fosfato de potássio 50 mM e pH 7,0; 7 U/mL, 50 °C e 120 RPM. Letras iguais representam que não houve diferença estatística significativa entre os parâmetros avaliados em um nível de confiança de 5 %.....	109
Tabela 10 – Influência da variação na razão inicial de lactose:frutose na reação de hidrólise da lactose e produção de lactulose, utilizando soro de leite e $\beta$ -galactosidase de <i>K. lactis</i> livre. Condições reacionais: concentração total de substrato = 200 g/L ( $\pm$ 10 g/L); tampão fosfato de potássio 50 mM e pH 7,0; 7 U/mL, 50 °C e 120 RPM por 10 minutos. Letras iguais representam que não houve diferença estatística significativa entre os parâmetros avaliados em um nível de confiança de 5 %...	116

Tabela 11 – Influência da variação na razão inicial de lactose:frutose na reação de hidrólise da lactose e produção de lactulose, utilizando soro de leite e  $\beta$ -galactosidase de *K. lactis* imobilizada em quitosana ativada com glutaraldeído. Condições reacionais: concentração total de substrato = 200 g/L ( $\pm$  10 g/L); tampão fosfato de potássio 50 mM e pH 7,0; 7 U/mL, 50 °C e 120 RPM por 10 minutos. Letras iguais representam que não houve diferença estatística significativa entre os parâmetros avaliados em um nível de confiança de 5 %..... 119

Tabela 12 – Percentuais de hidrólise e concentrações máximas de lactulose obtidos após incubação do biocatalisador a 50 °C por 30 minutos em tampão fosfato de potássio (50 mM e pH 7,0), lactose (66,7 g/L) e frutose (133,3 g/L). Condições reacionais: concentração total de substrato = 200 g/L ( $\pm$  10 g/L); tampão fosfato de potássio 50 mM e pH 7,0; 7 U/mL e 120 RPM por 10 min..... 140

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	21
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	25
<b>2.1</b>	<b>Objetivo geral</b> .....	25
<b>2.2</b>	<b>Objetivos específicos</b> .....	25
<b>3</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	26
<b>3.1</b>	<b>Alimentos funcionais</b> .....	26
<b>3.2</b>	<b>Prebióticos e suas características</b> .....	26
<b>3.3</b>	<b>Propriedades fisiológicas dos oligossacarídeos</b> .....	34
<b>3.4</b>	<b>Oligossacarídeos e formas de obtenção</b> .....	37
<b>3.5</b>	<b>Lactulose</b> .....	44
<b>3.5.1</b>	<i>Aplicações da lactulose</i> .....	47
<b>3.6</b>	<b>Processo de produção de lactulose por rota química</b> .....	49
<b>3.7</b>	<b>Processo de produção de lactulose por rota enzimática</b> .....	51
<b>3.7.1</b>	<i>Rafinose e estaquiose</i> .....	55
<b>3.8</b>	<b><math>\beta</math>-galactosidases</b> .....	59
<b>3.8.1</b>	<i>Otimização das propriedades enzimáticas através de processos de imobilização e sua aplicação na síntese de lactulose</i> .....	67
<b>3.8.1.1</b>	<i>Imobilização de <math>\beta</math>-galactosidases por adsorção</i> .....	69
<b>3.8.1.2</b>	<i>Imobilização de <math>\beta</math>-galactosidases por aprisionamento</i> .....	70
<b>3.8.1.3</b>	<i>Imobilização de <math>\beta</math>-galactosidases por ligações covalentes</i> .....	72
<b>3.9</b>	<b>O uso de resíduos industriais como substratos para produtos de valor agregado</b> .....	79
<b>3.9.1</b>	<i>O setor de laticínios</i> .....	79
<b>3.9.2</b>	<i>O soro de leite</i> .....	82
<b>3.9.3</b>	<i>O uso do soro de leite como substrato para produção de oligossacarídeos e a integração de processos como forma de otimização da produção de lactulose</i> .....	84
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	87
<b>4.1</b>	<b>Material</b> .....	87
<b>4.1.1</b>	<i>Reagentes</i> .....	87
<b>4.1.2</b>	<i>Enzimas</i> .....	87
<b>4.2</b>	<b>Métodos</b> .....	87

4.2.1	<i>Determinação da atividade enzimática da <math>\beta</math>-galactosidase pela hidrólise do substrato ONPG</i> .....	87
4.2.2	<i>Determinação da atividade de transgalactosilação da <math>\beta</math>-galactosidase</i> .....	88
4.2.3	<i>Imobilização de <math>\beta</math>-galactosidase de <i>Kluyveromyces lactis</i> em quitosana ativada com glutaraldeído</i> .....	89
4.2.4	<i>Determinação dos parâmetros de imobilização</i> .....	89
4.2.5	<i>Determinação dos parâmetros de avaliação do processo de hidrólise e de produção de lactulose</i> .....	90
4.2.6	<i>Avaliação da eficiência catalítica dos biocatalisadores obtidos no processo de hidrólise de lactose e produção de lactulose</i> .....	91
4.2.7	<i>Avaliação da influência dos substratos nas reações de hidrólise e de transgalactosilação através da alteração na razão lactose:frutose</i> .....	91
4.2.8	<i>Avaliação da produção de lactulose utilizando soro de leite como substrato</i> .....	92
4.2.9	<i>Avaliação da configuração operacional do processo de produção de lactulose por <math>\beta</math>-galactosidase de <i>K. lactis</i> e o uso da glicose-isomerase de <i>Streptomyces murinus</i> para otimizar o processo</i> .....	92
4.2.10	<i>Avaliação da redução da carga de proteína por grama de suporte para otimização da produção de oligossacarídeos</i> .....	94
4.2.11	<i>Comparação entre o uso de <math>\beta</math>-galactosidases de <i>K. lactis</i> e <i>A. oryzae</i></i> .....	94
4.2.12	<i>Avaliação do processo de hidrólise da lactose do soro de leite por <math>\beta</math>-galactosidase de <i>Kluyveromyces lactis</i> em reator de leito fixo</i> .....	95
4.3	<b>Métodos analíticos</b> .....	96
4.3.1	<i>Determinação da concentração de proteínas</i> .....	96
4.3.2	<i>Quantificação dos carboidratos</i> .....	96
4.3.3	<i>Análises estatísticas</i> .....	97
5	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	98
5.1	<b>Processo de imobilização</b> .....	98
5.2	<b>Avaliação da razão lactose:frutose na hidrólise da lactose e na produção de lactulose</b> .....	101
5.2.1	<i>Estudos com lactose pura</i> .....	102
5.2.2	<i>Estudos com soro de leite</i> .....	113
5.3	<b>Influência da temperatura no processo de hidrólise da lactose e produção de lactulose</b> .....	124

5.3.1	<i>Avaliação da estabilidade operacional do biocatalisador em diferentes temperaturas</i> .....	128
5.3.2	<i>Avaliação da estabilidade operacional do biocatalisador após o processo de incubação a 50 °C e com reações ocorrendo em diferentes temperaturas</i> .....	131
5.4	<b>Influência do meio reacional no processo de hidrólise da lactose e na produção de lactulose</b> .....	136
5.5	<b>Avaliação da configuração operacional do processo de produção de lactulose por <math>\beta</math>-galactosidase de <i>K. lactis</i> e o uso da glicose isomerase para otimização do processo</b> .....	141
5.6	<b>Avaliação da redução da carga proteica por grama de suporte para otimização da produção de oligossacarídeos</b> .....	151
5.7	<b>Comparação das reações utilizando <math>\beta</math>-galactosidases de <i>Kluyveromyces lactis</i> e de <i>Aspergillus oryzae</i></b> .....	155
5.8	<b>Estudos de produção enzimática de lactulose em modo contínuo em reator de leito fixo</b> .....	157
5.8.1	<i>Avaliação da hidrólise do soro de leite em reator de leito fixo</i> .....	157
6	<b>CONCLUSÕES</b> .....	162
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	165

## 1 INTRODUÇÃO

Alimentos funcionais podem ser definidos como produtos que se assemelham a alimentos convencionais, mas que trazem benefícios fisiológicos específicos e que, de forma geral, são obtidos pela combinação de alimentos com compostos que possuam essas características (AL-SHERAJI *et al.*, 2013; MOHANTY *et al.*, 2018; QUIGLEY, 2019). Os benefícios fisiológicos observados associados à ingestão desses compostos incluem, desde melhorias no sistema circulatório, até a prevenção de doenças associadas ao trato intestinal (AL-SHERAJI *et al.*, 2013; ILLANES, 2016). Assim, a busca pela produção desses compostos vem ganhando destaque na comunidade científica devido às inúmeras possibilidades associadas ao seu uso.

Em geral, os seres humanos conseguem obter a quantidade necessária de compostos funcionais para suplementação dietética em alimentos naturais, como os ricos em fibras, por exemplo. No entanto, é possível produzir compostos que podem agir de maneira integrada com alimentos convencionais e presentes na dieta humana, sendo esses compostos conhecidos como prebióticos. Essas substâncias são carboidratos de cadeia curta, não digeríveis pelas enzimas digestivas presentes no trato intestinal humano, chegando ativas a determinadas regiões, favorecendo a fermentação seletiva de determinados microrganismos benéficos presentes no trato gastrointestinal (ILLANES; GUERRERO, 2016; MOHANTY *et al.*, 2018; MUSSATTO; MANCILHA, 2007; SAKO; MATSUMOTO; TANAKA, 1999). Nesse contexto, um dos principais compostos com características prebióticas que vem sendo alvo de estudos é a lactulose. Esse composto é um dissacarídeo formado por uma molécula de galactose e uma molécula de frutose, ligadas por uma ligação *o*-glicosídica. Em geral, pode ser obtida a partir da isomerização alcalina da lactose, ocorrendo um rearranjo da porção de glicose em frutose, formando a molécula de lactulose. No entanto, também pode ser obtida por rota biológica, aplicando-se enzimas que atuem na formação de um complexo de transição enzima-galactosil estável e que interaja com um composto que possa atuar como um nucleófilo eficaz para formação de uma molécula de lactulose estável (ABURTO *et al.*, 2020; AIDER; HALLEUX, 2007; GUERRERO; ILLANES, 2016). Dessa forma, um dos problemas a se resolver no processo de produção de lactulose (seja por via química ou por via enzimática) é a obtenção de uma fonte de lactose abundante e barata, a qual possa ser utilizada de maneira eficaz, sem impor limitações técnicas e econômicas ao processo.

No setor alimentício, a indústria de laticínios contribui de várias maneiras e com diversos resíduos, sendo o soro de leite, obtido principalmente da produção de queijos, um dos principais subprodutos desse setor. Em 2019, segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), a produção nacional de leite cru, resfriado ou não, foi de aproximadamente 34.520 milhões de litros (EMBRAPA, 2020). Em média, utiliza-se 10 litros de leite para produção de 1 Kg de queijo, e até 90% do leite utilizado torna-se soro de leite (CONAQ, 2018). Segundo dados da Associação Brasileira das Indústrias de Queijo (ABIQ), a produção nacional de queijos no ano de 2019 foi de 1,12 milhões de toneladas por ano, o que deve ter gerado em média 10,08 bilhões de litros de soro de leite por ano (ABIQ, 2020). O percentual mássico do soro é em torno de 5 a 8 % (m/m) de sólidos, sendo 60-80% lactose, de 10 a 20% proteínas e, o restante, corresponde a minerais (VAMVAKAKI *et al.*, 2010). Devido a sua alta carga orgânica, seu descarte requer tratamento prévio para se enquadrar as normas legais e evitar problemas ambientais. Além disso, sua alta Demanda Biológica de Oxigênio (DBO = 50000 mg/L) e Demanda Química de Oxigênio (DQO = 80000 mg/L) também são importantes fatores que contribuem para a geração de problemas ambientais (HELEN SHIPHRAH *et al.*, 2013; KOUTINAS *et al.*, 2009).

Devido ao seu alto valor nutricional, o soro de leite é utilizado no setor agropecuário, como fertilizante e na suplementação de rações (DE PAULA *et al.*, 2011; ESCALANTE *et al.*, 2018; MANTOVANI *et al.*, 2015; ZUÑIGA, 2003), na suplementação alimentar, devido ao seu alto teor de lactose, como aditivo funcional em alimentos infantis (DE ALBUQUERQUE *et al.*, 2018; FASSINA *et al.*, 2019). Além disso, existem trabalhos que relatam o uso desse subproduto como substrato para produção de enzimas por fermentação, a exemplo a enzima  $\beta$ -galactosidase (DE ALBUQUERQUE *et al.*, 2018; FISCHER; KLEINSCHMIDT, 2018; LIMA *et al.*, 2013; ZOTTA *et al.*, 2020).

O uso da lactose presente no soro de leite como substrato para a produção de compostos de valor agregado, como os oligossacarídeos, galactooligossacarídeos, lactulose, frutooligossacarídeos, entre outros, fazer é um processo que já está em desenvolvimento (GÄNZLE, 2012; LI, Pei jun *et al.*, 2016; PADILLA *et al.*, 2015). Nesse cenário, métodos enzimáticos surgem como alternativa promissora aos métodos químicos. (AIDER; HALLEUX, 2007; DE ALBUQUERQUE *et al.*, 2018; GÄNZLE, 2012; GUERRERO *et al.*, 2019; NGUYEN *et al.*, 2018; PANESAR, Parmjit S.; KUMARI, 2011; SONG *et al.*, 2013a; YIN *et al.*, 2017). A obtenção dos oligossacarídeos por via enzimática ocorre por duas principais formas: a primeira, por meio da isomerização da lactose, através de rearranjos moleculares, e a

segunda, por meio da formação de pontes  $\beta$ -glicosídicas, formadas pelas  $\beta$ -galactosidases (MUSSATTO; MANCILHA, 2007).

$\beta$ -galactosidases (EC 3.2.1.23) são enzimas amplamente utilizadas em reações de hidrólise da lactose e de transgalactosilação, nas quais ocorre a síntese e “quebra” de carboidratos, como a própria lactose, lactulose e outros. Podem ser obtidas de uma série de microrganismos vegetais e animais, sendo os tipos mais utilizados oriundos de *Kluyveromyces lactis* e *Aspergillus oryzae* (ANSARI; SATAR, 2012; PANESAR, Parmjit S.; KUMARI; PANESAR, 2010; ZHU, Fan *et al.*, 2018). No entanto, existem problemas nas estratégias de produção desses compostos por via enzimática que ainda limitam o processo. Por exemplo, alguns tipos de cepas que produzem a  $\beta$ -galactosidase tendem a demonstrar uma tendência favorável a atividade hidrolítica em detrimento da atividade de transgalactosilação da enzima, já que  $\beta$ -galactosidases são enzimas capazes de catalisar ambos os tipos de reação (XAVIER; RAMANA; SHARMA, 2018). É necessário não apenas saber que as reações ocorrem e podem ser catalisadas pela enzima, mas saber os fatores que podem alterar e/ou afetar o máximo rendimento da reação.

O presente estudo apresenta estratégias para produção de oligossacarídeos, como a lactulose (a qual já se sabe ser possível produzir pelos métodos aqui expressos), aliada ao entendimento de fatores físicos, químicos e fisiológicos que influenciam no rendimento do processo. Ou seja, num primeiro momento, se faz necessário entender e ratificar fatores e hipóteses que já se sabem afetar a reação, para partir para um segundo momento e buscar alterações operacionais que otimizem o processo como um todo. Posteriormente, explorou-se o uso de outros biocatalisadores que pudessem otimizar etapas pontuais do processo (como a produção de frutose a partir da glicose, por glicose-isomerase de *Streptomyces murinus*), bem como alterações nos reatores utilizados (tantos nos arranjos, quanto nos tipos), visando obter um processo integrado eficiente e eficaz.

Estudos que apresentam processos de produção de lactulose por rotas biológicas, em geral, enfrentam problemas em comum e procuram focar em soluções associadas ao aperfeiçoamento do biocatalisador, através de técnicas que otimizem o seu rendimento e sua eficiência (ILLANES, 2016; URRUTIA *et al.*, 2018; VERA; GUERRERO; ILLANES, 2011). Em geral, o rendimento na produção de galactooligossacarídeos, por exemplo, raramente excede os 40% ( $m_{GOS}/m_{lactose}$ ), alcançando de 20 a 40% de produção. De forma semelhante são os rendimentos obtidos na produção de lactulose, com um detalhe referente às características específicas das reações de transgalactosilação que diferencia tais reações das demais: por ser

uma enzima não específica, a  $\beta$ -galactosidase pode interagir com diferentes nucleófilos, fazendo com que fatores como concentração de substratos e do produto formado nos meios reacionais, interfiram diretamente no rendimento de lactulose. Em geral, esses problemas são relacionados ao fato da reação de transgalactosilação ser cineticamente controlada, dependendo, então, das concentrações dos compostos envolvidos e presentes no meio (GUERRERO; WILSON, 2016; ILLANES; VERA; WILSON, 2016). No entanto, não é comum observar estudos que reportem as mudanças nas configurações operacionais do sistema, envolvendo modificações, como alterações no sistema reacional, a partir do uso de reatores alternativos aos convencionalmente usados, buscando associar tais mudanças em um único processo integrado. Grande parte dos trabalhos (GENNARI; MOBAYED; DA ROLT NERVIS; *et al.*, 2019; HAIDER; HUSAIN, 2007; JOCHEMS *et al.*, 2014; LIMA *et al.*, 2013; MÖRSCHBÄCHER; VOLPATO; SOUZA, 2016) se preocupa em desenvolver um biocatalisador eficiente e que possa ser utilizado da forma convencional nos processos tradicionais. No presente estudo, avaliações que visam compreender e corroborar com hipóteses estabelecidas e consideradas na produção de lactulose, aliados ao uso de diferentes conformações reacionais e ao uso de biocatalisadores que possam auxiliar em determinada etapa das reações, foram o foco dos experimentos apresentados ao longo do trabalho. Para isso, cada etapa da reação, explicitada ao decorrer do texto, foi primeiramente analisada de forma individual para, após isso, ser integrada a um processo único e otimizado de produção.

Assim, neste primeiro momento, a presente tese traz consigo um compilado de informações teóricas e técnicas, acerca do tema proposto acima, expostos na seção de Revisão Bibliográfica. Em um segundo momento, seguiu-se para a parte experimental, onde foram expostos metodologias e materiais necessários para realização dos estudos propostos para obtenção dos dados que refutem a tese proposta. Os experimentos obtidos visam corroborar para aquisição de dados que colaborem para otimização do processo de produção de oligossacarídeos, como os galactooligossacarídeos e a lactulose, utilizando o soro de leite como substrato. A otimização seguiu uma metodologia de arranjo de reatores e combinação de biocatalisadores para um melhor resultado na produção do composto em questão, aproveitando um subproduto industrial.

A seguir, será apresentado o objetivo principal deste estudo, bem como os objetivos específicos.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Avaliar o processo de produção de oligossacarídeos, em especial da lactulose, por  $\beta$ -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* utilizando o soro de leite, desenvolvendo e otimizando, assim, um processo que integre o aproveitamento desse subproduto industrial, através de rotas enzimáticas convencionais previamente avaliadas.

### 2.2 Objetivos específicos

- i. Avaliar a melhor carga de proteína utilizada na imobilização de  $\beta$ -galactosidase de *K. lactis* em quitosana ativada com glutaraldeído 0,8 % (v/v);
- ii. Estudar o efeito de diferentes razões de substrato (lactose:frutose) sobre a hidrólise da lactose e a transgalactosilação (síntese da lactulose);
- iii. Analisar o efeito que a temperatura tem nas reações, hidrólise e transgalactosilação, através de processos de manutenção à temperatura ótima, avaliando a estabilidade operacional do biocatalisador utilizado;
- iv. Estudar o efeito dos componentes do meio reacional, avaliando a incubação prévia do biocatalisador em soluções que simulem as condições reacionais obtidas ao longo do processo;
- v. Avaliar os processos integrados para produção de lactulose, utilizando os parâmetros obtidos nos estudos anteriores;
- vi. Analisar o uso da enzima glicose-isomerase para auxiliar no processo de formação de lactulose após a hidrólise do soro de leite, através da isomerização da glicose liberada no meio;
- vii. Avaliar o uso de reatores de leito fixo nas etapas de hidrólise e de transgalactosilação, e seu uso no processo integrado.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Alimentos funcionais

Nas últimas décadas a busca por alimentos funcionais tem ganhado espaço em diversos estudos científicos (ALONSO; RENDUELES; DÍAZ, 2015; GIBSON; RASTALL, 2012; PANESAR, P. S.; BALI, 2015; XI *et al.*, 2021). Alimentos funcionais podem ser definidos como alimentos que geram benefícios saudáveis ao organismo e diminuem o risco do surgimento de doenças crônicas causadas por dietas inadequadas (AL-SHERAJI *et al.*, 2013). Alguns estudos sugerem que os alimentos funcionais trazem benefícios, como melhoras no sistema imunológico e na saúde do coração, diminuição do risco de câncer, aprimoramento da saúde gastrointestinal, redução nos sintomas da menopausa e osteoporose, preservação do trato urinário entre outros (AL-SHERAJI *et al.*, 2013; HASLER, 1998; SHAHIDI, 2006).

Os alimentos funcionais podem receber três tipos de classificação, de acordo com Al-Sheraji e colaboradores (2013): (a) alimentos usuais, que naturalmente possuam em sua composição substâncias bioativas; (b) alimentos suplementados com essas substâncias bioativas; e (c) alimentos derivados introduzidos na alimentação convencional. Os dois primeiros casos são conhecidos como alimentos probióticos e o último caso, conhecido como alimentos prebióticos. Prebióticos são carboidratos de cadeia curta e não digestíveis pelas enzimas presentes no trato intestinal humano, sendo componentes não-ativos de alimentos e que promovem uma fermentação seletiva no cólon, proporcionando um aumento no crescimento e atividade de bactérias benéficas ao organismo do hospedeiro (GIBSON *et al.*, 2004). As principais moléculas com propriedades prebióticas são do tipo di-, tri-, oligo-, polissacarídeos, amidos resistentes à digestão e alguns tipos de polióis de açúcar (AL-SHERAJI *et al.*, 2013). Diversas características fazem com que o interesse mundial por esses compostos tenha se expandido, mostrando que seu potencial vai desde aplicações em setores alimentícios, até a produção de fármacos utilizados para diversos fins.

#### 3.2 Prebióticos e suas características

Alguns critérios são utilizados para se classificar um carboidrato não digestível como prebiótico: (a) o carboidrato deve ser resistente ao suco gástrico e às enzimas presentes no trato intestinal mamífero; (b) deve ser sensível à fermentação pelas bactérias intestinais e (c) ter a capacidade de aumentar a viabilidade/atividade de tais bactérias. É importante entender que os prebióticos agem em associação com as bactérias benéficas ao organismo do hospedeiro,

conhecidas com probióticos, gerando benefícios como inibição de patógenos, estimulação imunológica, redução no colesterol e no risco de doenças cardiovasculares entre outros (GIBSON; RASTALL, 2012; ROBERFROID *et al.*, 2010).

No processo de digestão, os compostos prebióticos passam pelo intestino pequeno e chegam ao intestino inferior, onde são metabolizados por bactérias probióticas presentes nessa região do sistema digestivo. Os principais compostos prebióticos metabolizados na dieta humana são lactulose, galactooligossacarídeos, frutooligossacarídeos, inulina e maltooligossacarídeos (ILLANES; GUERRERO, 2016; JASKARI *et al.*, 1998; PATEL; GOYAL, 2011). Em geral, no intuito de se obter efeitos sinérgicos em compostos alimentícios, misturas de compostos prebióticos e probióticos podem ser utilizadas (misturas simbióticas). Como exemplo, RaftilosesP95 (prebiótico) combinada com um iogurte rico em *Lactobacillus casei* (probiótico), causa um aumento em seu tempo de estocagem, podendo ser armazenada por mais tempo e aumentando a viabilidade do microrganismo probiótico presente em sua composição (CAPELA; HAY; SHAH, 2006); o desenvolvimento de um queijo *cottage* com a presença de *Lactobacillus delbrueckii* e inulina (ARAÚJO *et al.*, 2010), bem como a produção de um leite fermentado por bactérias probióticas utilizando farinha de banana verde como substrato (BATISTA *et al.*, 2017), são outros exemplos de misturas simbióticas que podem trazer benefícios associados ao seu consumo. A Tabela 1 apresenta alguns dos principais prebióticos estudados e utilizados, bem como suas estruturas moleculares e fontes de obtenção.

Tabela 1 – Principais prebióticos, suas estruturas moleculares e suas fontes de obtenção (continua).

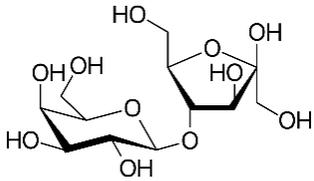
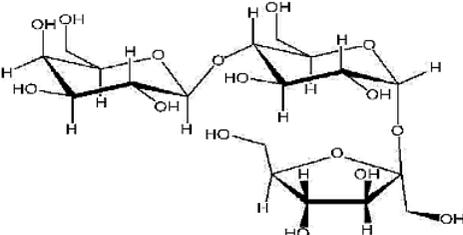
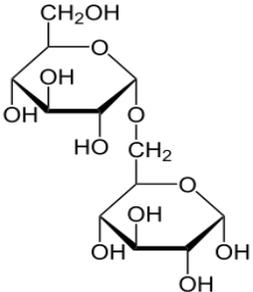
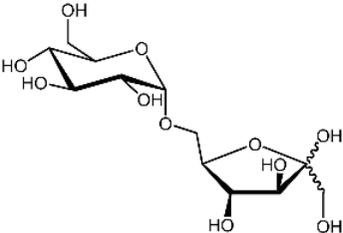
Prebiótico	Estrutura molecular	Fonte de obtenção	Referência
Lactulose		Lactose	GUERRERO; ILLANES, 2016; PANESAR, Parmjit S.; KUMARI, 2011; VERA; ILLANES, 2016.
Lactosucrose		Lactose	DUARTE <i>et al.</i> , 2017; LI, Wei <i>et al.</i> , 2015.
Isomaltose		Sucrose	SAWALE <i>et al.</i> , 2017; SHYAM; RAMADAS; CHANG, 2018.
Palatinose		Sucrose	GUGGISBERG; PICCINALI; SCHREIER, 2011; PANESAR, P. S.; BALI, 2015; SAWALE <i>et al.</i> , 2017.

Tabela 1 – Principais prebióticos, suas estruturas moleculares e suas fontes de obtenção (continua).

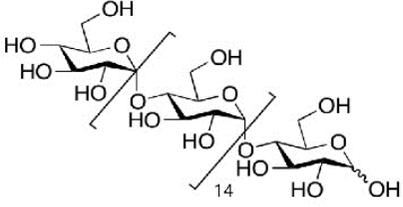
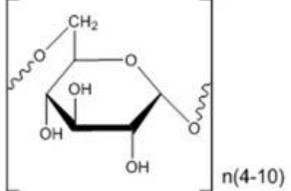
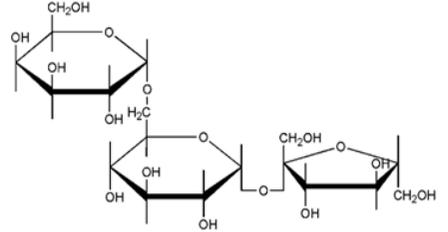
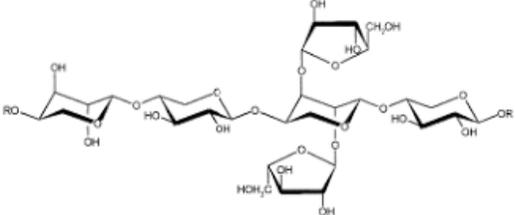
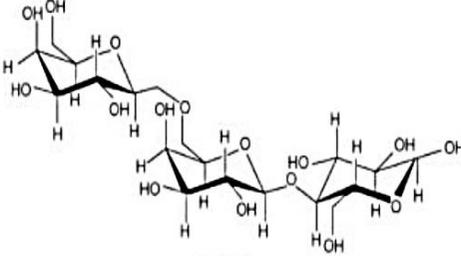
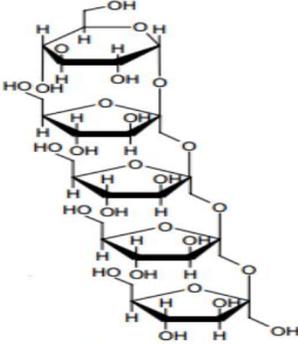
Prebiótico	Estrutura molecular	Fonte de obtenção	Referência
Maltooligossacarídeos		Amido	NAWAWI <i>et al.</i> , 2020.
Isomaltooligossacarídeos		Amido	KANEKO <i>et al.</i> , 1994.
Oligossacarídeos da soja		Soja	MA <i>et al.</i> , 2017.
Xilooligossacarídeos		Brotos de bambu, frutas, vegetais, leite, mel	ILLANES; VERA; WILSON, 2016; RIBEIRO <i>et al.</i> , 2018.

Tabela 1 – Principais prebióticos, suas estruturas moleculares e suas fontes de obtenção.

Prebiótico	Estrutura molecular	Fonte de obtenção	Referência
Galactooligossacarídeos		Leite humano e bovino	FISCHER; KLEINSCHMIDT, 2015; KLEIN <i>et al.</i> , 2016.
Frutoooligossacarídeos		Aspargos, beterraba, alho, cebola, mel, banana, tomate, centeio, chicória	KONDO <i>et al.</i> , 2020; LI, Pei jun <i>et al.</i> , 2016.

Fonte: Adaptado de Al-Sheraji et al. (2013).

As propriedades do prebiótico dependem de fatores como a sua composição monossacarídica, suas ligações glicosídicas e seu peso molecular. As moléculas precursoras dos prebióticos utilizados na dieta humana são glicose, galactose, frutose e xilose (MOHANTY *et al.*, 2018; ROBERFROID *et al.*, 2010). As ligações glicosídicas entre esses monossacarídeos influenciam tanto na digestibilidade no intestino pequeno, quanto na seletividade fermentativa. Por exemplo, a fermentação de frutooligossacarídeos por probióticos do gênero *Bifidobacterium*, *Acidophilus* e *Lactobacillus* é seletiva devido as ligações do tipo  $\beta$ -frutofuranosidase existentes entre as células dessas bactérias e entre as moléculas precursoras dos frutooligossacarídeos. Em relação ao peso molecular, a maioria dos prebióticos possui baixo peso molecular, com exceção da inulina (1600 g/mol). Porém, a maior parte dos carboidratos de sua composição (inulina) possuem baixo grau de polimerização (em média 14), sendo que as propriedades prebióticas surgem quando esses carboidratos estão associados. Por exemplo, a xilana isoladamente também não possui efeitos prebióticos, mas ao estar associada na forma de xilooligossacarídeos tais efeitos passam a surgir. Dessa forma, é interessante verificar que quanto maior o peso molecular, ou seja, quanto maior a cadeia de monossacarídeos que compõem o prebiótico, então mais demorada será a fermentação (a quebra da molécula), fazendo com que os efeitos prebióticos sejam sentidos mais efetivamente nas regiões mais interiores do cólon. É o caso da inulina, a qual permite que seus efeitos sejam sensíveis em regiões mais distantes do cólon, quando comparada, por exemplo, aos frutooligossacarídeos, que possuem menor peso molecular e, conseqüentemente, são fermentados de maneira mais rápida (FINEGOLD *et al.*, 2014; JASKARI *et al.*, 1998; PANESAR, P. S.; BALI, 2015).

De acordo com a IUPAC-IUB (2020), oligossacarídeos são os carboidratos que apresentam entre 3 e 10 moléculas de monossacarídeos em sua cadeia. O conceito de “carboidrato não-digestível” se dá devido ao fato de que o átomo de C anomérico (C1 ou C2) das unidades de monossacarídeos de alguns oligossacarídeos, possui uma conformação que torna suas ligações osídicas não suscetíveis a atividade hidrolítica das enzimas presentes no trato intestinal humano (ROBERFROID *et al.*, 2010; ROBERFROID; SLAVIN, 2000). Também são solúveis em água e um pouco mais adocicados do que a sacarose (entre 0,3 e 0,6 vezes mais doce). Além disso, em casos que se deseja obter alimentos muito doces, o uso de oligossacarídeos no processo de mistura é favorável, já que o uso de adoçantes artificiais (aspartames e sucraloses, por exemplo) pode deixar sabores indesejáveis no produto final. Então, a adição de oligossacarídeos no processo de produção desses alimentos pode mascarar tais sabores indesejáveis, além de conferir um aumento na viscosidade da mistura, gerando um

produto final com uma melhor textura (CRITTENDEN; PLAYNE, 1996). Na verdade, o grau de doçura do oligossacarídeo irá depender de seu grau de polimerização, bem como dos monossacarídeos presentes em sua composição, sendo que quanto maior a cadeia dos oligossacarídeos, menos doce este será. Tal propriedade de dulcificação é bastante útil na indústria alimentícia, quando se é necessário a substituição da sacarose devido às restrições ao seu alto grau de doçura (MUSSATTO; MANCILHA, 2007). Em termos de valores calóricos os oligossacarídeos apresentam entre 1,5 e 2,0 Kcal/g, correspondendo a uma faixa entre 40-50 % dos valores calóricos de carboidratos mais utilizados, como a sacarose, por exemplo (SAKO; MATSUMOTO; TANAKA, 1999).

Finegold e colaboradores (2014) conduziram um estudo para determinar a tolerância e os efeitos de xilooligossacarídeos na composição da microbiota do cólon humano, avaliando se as possíveis mudanças trariam consigo efeitos colaterais. Para tal, um grupo de 32 indivíduos adultos e saudáveis foi utilizado em um estudo duplo-cego e aleatório, controlado por placebo. Doses de 1,4 e 2,8 g de xilooligossacarídeos (além do placebo) foram ministradas semanalmente. Os autores observaram que tal oligossacarídeo foi tolerado sem efeitos gastrointestinais significativos, além de apresentar um aumento da população de bifidobactérias, sendo esse aumento maior no grupo que ingeriu 2,8 g do prebiótico. O estudo mostrou que a suplementação alimentar com xilooligossacarídeos foi benéfica para microbiota gastrointestinal (FINEGOLD *et al.*, 2014).

Ma e colaboradores (2017) avaliaram se o uso de oligossacarídeos oriundos da soja tem efeitos sobre as comunidades microbianas intestinais e a possibilidade de ocorrer uma modulação imunológica em camundongos. As doses de oligossacarídeos foram aplicadas intragastricamente por 22 dias (um total de 4 g de oligossacarídeos da soja por Kg de massa corporal). Após esse período, foi constatado um aumento significativo da proliferação de bifidobactérias e bactérias do ácido lático, fatores que contribuíram para uma otimização da comunidade microbiana do cólon. Além disso, notou-se aumento no percentual de linfócitos-T e na sua proliferação, juntamente com diferenças significativas na produção de hemolisinas, aumento na atividade antileucêmica das células “*Natural Killer*” e na atividade fagocitária, aumento na produção de citocinas e nos níveis imunoglobina, mostrando que foi possível também promover uma modulação imunológica, melhorando-se as funções de defesa do organismo dos camundongos (MA *et al.*, 2017).

Além dos benefícios já mencionados (a maioria relacionado com melhorias na microbiota colônica e efeitos imunomodulatórios), um estudo mais atual, proposto por Kondo

e colaboradores (2020), mostra que o uso de frutooligossacarídeos pode ajudar a reduzir os sintomas da perda auditiva sensorial, causada, dentre outros fatores, por maus hábitos alimentares e uma má nutrição. Os efeitos da ingestão dos oligossacarídeos mostraram alterações nas expressões gênicas e na proteção do neurônio ganglionar espiral no ouvido interno de camundongos diagnosticados com perda auditiva progressiva de início precoce. Os resultados mostraram que, no ouvido interno, a expressão gênica da neurotrofina, o fator neurotrófico derivado do cérebro e seu receptor, e os receptores TRKB, SFCA e FFAR3 (receptores auditivos que emitem impulsos nervosos em resposta às vibrações sonoras) foram todos aumentados pelo uso de frutooligossacarídeos (KONDO *et al.*, 2020).

Dentre os principais tipos de prebióticos, os oligossacarídeos são os mais encontrados na natureza, sendo tipicamente de origem vegetal, mas também sendo encontrados em menor quantidade na forma de açúcares livres no leite humano e no colostro de vários animais (GIBSON *et al.*, 2004). Esses compostos devem promover o crescimento de organismos que geram benefícios ao metabolismo do hospedeiro e levam a uma alteração geral no balanço microbiano do cólon. Rycroft e colaboradores (2001) realizaram um estudo no qual promoveram a fermentação estática de bactérias fecais de seres humanos, utilizando como substrato frutooligossacarídeos, galactooligossacarídeos, xilooligossacarídeos, isomaltoligossacarídeos e lactulose. Eles constataram uma alteração na microflora intestinal, através de um aumento na população das bactérias do gênero *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*, e, em certos casos, uma redução nos níveis de bactérias prejudiciais ao organismo (RYCROFT *et al.*, 2001).

Em relação à estabilidade do oligossacarídeo, existe uma forte dependência de alguns parâmetros, como dos açúcares residuais presentes na sua estrutura, do formato do anel, da sua configuração anomérica e dos tipos de ligações presentes em sua conformação. Tais parâmetros diferem muito entre os vários tipos de oligossacarídeos existentes. Por exemplo, oligossacarídeos que possuem em sua estrutura um maior número de hexoses do que pentoses tendem a ter uma estrutura mais rígida, devido às hexoses possuírem interações intermoleculares mais intensas entre si. Do ponto de vista de ligação, pode-se observar aspecto semelhante. Em geral, ligações do tipo *o*-glicosídicas são mais fortes do que ligações do tipo *p*-glicosídicas, proporcionando uma maior estabilidade à molécula. Observa-se também que em pH abaixo de 4,0, tratamentos ou processos a altas temperaturas e altos períodos de estocagem, ocorre perda das propriedades físico-químicas e nutricionais desses compostos (MUSSATTO; MANCILHA, 2007; VORAGEN, 1998).

Sob o ponto de vista dos usos na indústria alimentícia, oligossacarídeos podem ser utilizados em diversos processos para o controle de propriedades físicas, químicas e até mesmo biológicas. Como exemplos de aplicações industriais, pode-se citar o controle de temperatura de alimentos congelados, alterando a temperatura de congelamento destes. Em processos que utilizem aquecimento, oligossacarídeos podem contribuir no controle das reações de *Maillard*, nas quais ocorre a junção do grupo carbonila dos açúcares redutores com o grupo amínico das proteínas, dos peptídeos ou dos aminoácidos (o aspecto dourado de alimentos assados é um exemplo desse tipo de reação), controlando a intensidade do escurecimento dos alimentos. Em processos que necessitem do controle microbiano, os oligossacarídeos podem ser utilizados para o controle de retenção de umidade, prevenindo a secagem em excesso e mantendo a água retida no alimento, com uma baixa atividade, o que é importante para evitar proliferação e contaminação microbiana (CRITTENDEN; PLAYNE, 1996; MUSSATTO; MANCILHA, 2007).

### **3.3 Propriedades fisiológicas dos oligossacarídeos**

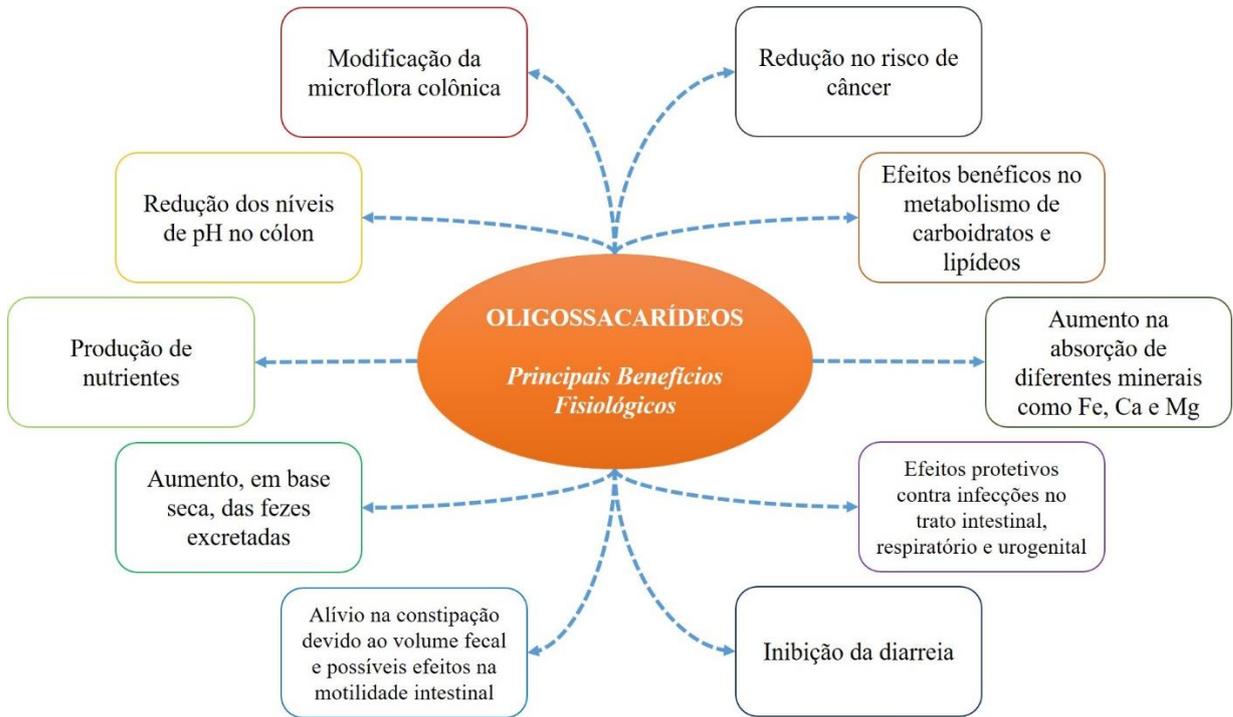
Além das propriedades físico-químicas, os oligossacarídeos despertam muita atenção, devido também às suas propriedades fisiológicas, que estão relacionadas aos benefícios com a saúde. Por exemplo, os oligossacarídeos podem ser usados como substitutos de açúcares convencionalmente utilizados em iogurtes, confeitaria, gomas de mascar e algumas bebidas, devido ao fato de que, diferente do amido e de açúcares simples, não são utilizados pela microflora bucal, evitando assim, a geração de compostos como ácidos e poliglucanos, que contribuiriam para o surgimento de cáries (CRITTENDEN; PLAYNE, 1996; PATEL; GOYAL, 2011).

A ausência, no trato intestinal humano, de enzimas responsáveis por hidrolisar ligações do tipo  $\beta$  é o que faz com que os oligossacarídeos não sejam digeríveis pelo organismo humano. Como tais compostos são basicamente formados por hexoses e pentoses, ligadas por esse tipo de ligação  $\beta$ , podem ser usados como adoçantes em dietas de baixa caloria e por pessoas que possuam alguma patologia relacionada com o processamento de açúcares no organismo, como a diabetes (GIBSON; RASTALL, 2012; ROBERFROID; SLAVIN, 2000; TORRES *et al.*, 2010). Grande parte desses carboidratos é hidrolisado na região superior do sistema gastrointestinal, o que faz com que os monossacarídeos resultantes sejam transportados na corrente sanguínea para o fígado, onde desempenham um papel tanto de substrato como de

reguladores das principais reações metabólicas. Porém, alguns oligossacarídeos resistem à passagem por todo processo digestivo, chegando à região do ceco-cólon. Nessa região, tais carboidratos são hidrolisados em monômeros e oligômeros, que serão metabolizados pela maior parte das bactérias anaeróbicas presentes nessa região gastrointestinal, produzindo gases do tipo H<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> e CH<sub>4</sub>, bem como alguns ácidos graxos de cadeia curta, como acetato, propionato, butirato e L-lactato (GIBSON *et al.*, 2004; ROBERFROID; SLAVIN, 2000). Dessa forma, pode-se perceber que, apesar de não serem utilizados para gerar energia direta ao organismo, o principal papel dos oligossacarídeos é de ser utilizado como substrato para fornecimento de energia indireta ao hospedeiro e um regulador metabólico, sendo que a quantidade e os tipos de subprodutos (ácidos graxos de cadeia curta e alguns gases) gerados no cólon, dependerão do tipo de oligossacarídeos usado como substrato, bem como da composição bacteriana da flora intestinal do hospedeiro (ROBERFROID *et al.*, 2010; SAKO; MATSUMOTO; TANAKA, 1999).

Os efeitos causados pela fermentação seletiva dos oligossacarídeos na região do ceco-cólon são função de fatores relacionados a composição do oligossacarídeo, bem como suas ligações glicosídicas, seu grau de polimerização, a sinergia entre o prebióticos e os probióticos presentes, a relação entre o substrato e os produtos formados durante a fermentação, a natureza da fermentação e a capacidade sacarolítica das bactérias que compõem essa região (GIBSON *et al.*, 2004; MUSSATTO; MANCILHA, 2007; ROBERFROID *et al.*, 2010; SAKO; MATSUMOTO; TANAKA, 1999; VORAGEN, 1998). A Figura 1 apresenta um esquema com os principais tipos de benefícios que a fermentação de oligossacarídeos pode gerar ao hospedeiro.

Figura 1 – Principais benefícios fisiológicos dos oligossacarídeos.



Fonte: Adaptado de Mussatto & Mancilha (2007).

Todos esses benefícios, além das características fisiológicas já mencionadas anteriormente, fazem com que os oligossacarídeos se enquadrem na definição de compostos funcionais. Tais efeitos chegam a ser comparados a dietas ricas em fibras, devido a características como aumento no bolo fecal, redução nos tempos de trânsito gastrointestinal, aumento no controle de glicose e modulação do metabolismo de triglicerídeos. No entanto, os oligossacarídeos apresentam vantagens quando comparados com esse tipo de dieta, pois necessitam de uma dosagem diária menor e não causam diarreia se consumidos até as doses recomendadas. (GIBSON *et al.*, 2004). Contudo, a dosagem necessária para se obter de forma otimizada tais efeitos benéficos, ainda vem sendo um gargalo nos estudos, já que tal valor varia para cada indivíduo, pois possuem suas próprias características referentes a flora intestinal (ROBERFROID *et al.*, 2010; ROBERFROID; SLAVIN, 2000).

Desai e colaboradores (2020) avaliaram a extração de oligossacarídeos do café verde residual de processos de extração de compostos aromáticos, e sua aplicação com prebióticos. Os métodos de extração utilizados foram enzimáticos, térmico e aquoso, rendendo uma média de 19,92 % de monoligossacarídeos. O potencial prebiótico dos oligossacarídeos extraídos foi avaliado usando espécies de *Lactobacillus* e foi observado que tais carboidratos otimizaram o crescimento desses microrganismos, os quais atuam diretamente em regiões do

trato intestinal. Por fim, avaliaram a resistência dos oligossacarídeos obtidos ao suco gástrico humano, notando que 90 % resistiram quando utilizado uma solução artificial de suco gástrico humano (pH = 1,0) (DESAI *et al.*, 2020).

### 3.4 Oligossacarídeos e formas de obtenção

Oligossacarídeos podem ser obtidos basicamente por quatro rotas diferentes: (i) extração a partir de fontes naturais; (ii) produção por rota microbiológica ou por via enzimática; (iii) por síntese química a partir de dissacarídeos, e (iv) por processos químicos de hidrólise de polissacarídeos (CRITTENDEN; PLAYNE, 1996; GULEWICZ *et al.*, 2000; PATEL; GOYAL, 2011).

Grande parte dos oligossacarídeos pode ser encontrada de forma natural, como componente de frutas, verduras, leite e mel. A concentração obtida na maioria dessas fontes naturais está em torno de 0,3 a 6 % em peso fresco. Rafinose e estaquiose são comumente encontradas em leguminosas, como soja e o feijão; xilooligossacarídeos podem ser encontrados em brotos de bambu e galactooligossacarídeos fazem parte da composição do leite, especialmente de colostros, podendo ser encontrados na forma livre ou glicoconjugados (FISCHER; KLEINSCHMIDT, 2015; PANESAR, P. S.; BALI, 2015; VORAGEN, 1998). Aspargos, beterraba, alho, chicória, cebola, mel, banana, tomate, trigo, centeio, cevada são fontes naturais para obtenção de frutooligossacarídeos. Palatinose (isomaltulose) pode ser encontrada no mel, cana-de-açúcar e produtos derivados do melaço (ILLANES; VERA; WILSON, 2016; JOHNSON *et al.*, 2013).

As formas de produção industrial de oligossacarídeos se baseiam na hidrólise de polissacarídeos e síntese química ou enzimática, a partir de dissacarídeos. Estes dois tipos de processos são capazes de produzir a maior parte dos oligossacarídeos conhecidos e de interesse comercial (com exceção dos oligossacarídeos da soja (rafinose e estaquiose), obtidos por extração direta) diferindo entre si apenas no grau de polimerização e nas posições das ligações glicosídicas (CRITTENDEN; PLAYNE, 1996). A Tabela 2 apresenta os principais processos industriais para obtenção de oligossacarídeos.

Tabela 2 – Principais processos de produção industrial de oligossacarídeos (continua).

Tipo de Oligossacarídeo	Processo de Produção Industrial	Referência
<i>Galactooligossacarídeos</i>	Comercialmente produzido a partir de soluções concentradas de lactose, obtidas da purificação do soro de leite bovino, através da ação de $\beta$ -galactosidases.	SAKO; MATSUMOTO; TANAKA, 1999.
<i>Frutooligossacarídeos</i>	Transfrutossilacção da sacarose por $\beta$ -frutosidases e hidrólise enzimática de polissacarídeos extraídos a partir de raízes de chicória.	CRITTENDEN; PLAYNE, 1996.
<i>Palatinose</i>	Fabricado a partir da sacarose, por um rearranjo enzimático da ligação glicosídica $\alpha(1\rightarrow2)$ -frutósido a $\alpha(1\rightarrow6)$ -frutósido, seguido de um processo de cristalização.	SAWALE <i>et al.</i> , 2017.
<i>Xilooligossacarídeos</i>	Processo de fabricação em 3 etapas: (i) tratamento enzimático de xilanas nativas que contêm material lignocelulósico; (ii) fracionamento químico do material lignocelulósico obtido, seguido de uma hidrólise enzimática, e (iii) degradação hidrolítica das xilanas à xilooligossacarídeos por vapor, água ou soluções de ácidos minerais.	DÁVILA <i>et al.</i> , 2019.
<i>Maltooligossacarídeos</i>	Produzidos a partir do amido pela ação de enzimas de desagregação, tais como pululanase e amilase, combinado com hidrólise por $\alpha$ -amilases.	CRITTENDEN; PLAYNE, 1996.

Tabela 2 – Principais processos de produção industrial de oligossacarídeos.

Tipo de Oligossacarídeo	Processo de Produção Industrial	Referência
<i>Lactosacarose</i>	Produzido usando lactose e sacarose como matéria prima em reações enzimáticas.	VERA; ILLANES, 2016.
<i>Isomaltooligossacarídeos</i>	Produzido usando amido em reatores de 2 estágios: (i) o amido é liquefeito usando $\alpha$ -amilases e (ii) processado por $\beta$ -amilases (hidrólise do amido a maltose) e $\alpha$ -glicosidases (produz isomaltooligossacarídeos por reações de transglicosidação).	KANEKO <i>et al.</i> , 1994.
<i>Rafinose e estaquiose</i>	Podem ser diretamente extraídos de fontes vegetais, usando soluções aquosas de metanol ou etanol.	GULEWICZ <i>et al.</i> , 2000.
<i>Lactulose</i>	Produzido a partir da lactose por meio de um processo de isomerização alcalino, onde a porção de glicose presente na lactose é convertida em frutose, formando a lactulose. Pode ser obtida também a partir de rotas biológicas, utilizando enzimas do tipo $\beta$ -galactosidases, as quais na presença de lactose e frutose formam a lactulose.	DE ALBUQUERQUE <i>et al.</i> , 2018.

Fonte: Al-Sheraji et al. (2013).

Todavia, observa-se uma predominância de processos enzimáticos para produção de oligossacarídeos, nos quais pode ocorrer a construção da molécula a partir de açúcares mais simples, tanto por meio de reações de transgalactosilação; quanto por meio de hidrólises de polissacarídeos (GUERRERO; VERA; ILLANES, 2017b; MARTÍNEZ-VILLALUENGA *et al.*, 2008; SAKO; MATSUMOTO; TANAKA, 1999; XAVIER; RAMANA; SHARMA, 2018). Esses processos produzem espectro razoável de oligossacarídeos, diferindo entre si no grau de polimerização e na posição das ligações glicosídicas. Além disso, é comum, após esses processos, a presença de açúcares residuais que, em geral, são inertes e podem ser removidos através de processos de separação por membranas ou por cromatografia (CRITTENDEN; PLAYNE, 1996; MUSSATTO; MANCILHA, 2007; SAKO; MATSUMOTO; TANAKA, 1999).

Um dos grandes interesses na produção de galactooligossacarídeos é a possibilidade da adição desses compostos como ingrediente funcional no preparo de alimentos voltados ao desenvolvimento infantil. Isso se dá devido ao fato de que a presença de galactooligossacarídeos estimula desenvolvimento de uma microflora de bífidos, contribuindo para o desenvolvimento do sistema gastrointestinal. O processo de produção utiliza lactose, em processos a elevadas concentrações, como substrato para reação catalisada pela atividade galactosil-transferase de  $\beta$ -galactosidases, durante o processo de hidrólise da lactose (CRITTENDEN; PLAYNE, 1996; TORRES *et al.*, 2010). Empresas como *Yakult*© *Honsha Co.*, *Nissin*© *Sugar Manufacturing Company* e *Snow Brand Milk Products* já são referência no mercado e na produção de galactooligossacarídeos desde o início dos anos 90.

Devido a seus benefícios à saúde, os frutooligossacarídeos representam o maior volume de oligossacarídeos produzidos comercialmente, os quais já vêm sendo reportados desde a década de 90 (SRIDEVI *et al.*, 2014). Podem ser produzidos por duas rotas diferentes, gerando produtos finais semelhantes. No primeiro método, assim como na produção de galactooligossacarídeos, é necessário um meio contendo excesso de substrato. Nesse caso, a sacarose é o dissacarídeo utilizado na reação de transfrugalactosilação catalisada pela enzima  $\beta$ -frutofuranosidase (E.C. 3.2.1.26). Os frutooligossacarídeos formados dessa reação possuem de 2 a 4 resíduos  $\beta(1\rightarrow2)$ -frutósido, que podem ser ligados aos terminais residuais  $\alpha$ -D-glicose. O grupo *Beghin-Meiji Industries* (Paris, FR) comercializa frutooligossacarídeos obtidos a partir dessa rota sob a marca “*Actilight*®”. Nos EUA, esse composto é distribuído pela *Golden Technologies* (Westminster, CO) sob a marca “*NutraFlora*” (GANAIE; GUPTA; KANGO, 2013; KURAKAKE *et al.*, 2010; PARK; ALMEIDA, 1991). O segundo método utilizado para

produção comercial de frutooligossacarídeos consiste em uma hidrólise enzimática controlada por inulinases (E.C. 3.2.1.7) de polissacarídeos de inulina (inulina-oligossacarídeo) extraídos a partir de raízes de chicória. O processo de produção é semelhante ao descrito anteriormente com  $\beta$ -frutofuranosidase. No entanto, nem toda cadeia residual de  $\beta(1\rightarrow2)$ -frutósido irá se ligar a um terminal  $\alpha$ -D-glicose. Diferente da sacarose, a mistura obtida da hidrólise da inulina possui cadeias maiores de frutooligômeros, os quais podem se ligar entre si formando um tipo diferente de frutooligossacarídeo obtido no processo utilizando apenas sacarose como substrato para reação. Contudo, a diferença nos efeitos proporcionados no produto final é insignificante, fazendo com que o segundo processo também possa ser usado para fins de produção comercial. Esse tipo de processo é utilizado principalmente pela companhia belga ORAFIT® e o produto final é vendido com o nome comercial de Raftilose® (CRITTENDEN; PLAYNE, 1996; SRIDEVI *et al.*, 2014).

A palatinose é produzida basicamente a partir da sacarose, utilizando a enzima isomaltulose-sintase (E.C. 5.4.99.11) imobilizada. Em geral, a palatinose sintetizada enzimaticamente é digerível no intestino pequeno e pode ser usada como substituto do açúcar em dietas mais restritivas, além de promover a cárie dentária. Contudo, a palatinose formada pela desidratação intermolecular, formando uma molécula de carboidrato mais densa, consegue alcançar concentrações adequadas para estimular o crescimento das bifidobactérias. Diversas empresas atualmente produzem palatinose, sendo muitas delas ligadas a obtenção de produtos para dietas que direcionados ao desenvolvimento muscular com pouca ingestão de carboidratos. Porém, a *Mitsui Sugar Co.*, em Kanagawa no Japão, foi a pioneira no desenvolvimento do processo de produção em larga escala desse oligossacarídeo (GUGGISBERG; PICCINALI; SCHREIER, 2011; SAWALE *et al.*, 2017).

O mercado de xilooligossacarídeos inicialmente deteve os menores números, mas que cresceu de forma rápida. A matéria-prima utilizada para produção industrial é proveniente de materiais lignocelulósicos, os quais possuem o polissacarídeo xilana, encontrada de forma abundante em plantas, nas paredes celulares secundárias das dicotiledôneas e em todas as paredes celulares das gramíneas. A xilana passa por uma hidrólise enzimática controlada pela enzima endo-1,4- $\beta$ -xylanase (E.C. 3.2.1.8), no qual as xiloses necessárias para síntese dos xilooligossacarídeos são liberadas. Os oligossacarídeos formados nesse processo são separados usando ultrafiltração e processos de osmose reversa (CRITTENDEN; PLAYNE, 1996; RIBEIRO *et al.*, 2018).

O processo de formação de maltooligossacarídeos utiliza o amido como substrato, através da ação de enzimas de desagregação, tais como a pululanase (E.C. 3.2.1.41) e isoamilase (E.C. 3.2.1.68). Estas enzimas “desagregam” as unidades de [ $\alpha$ -D-Gli-(1 $\rightarrow$ 4)-], presentes na estrutura do amido. Em seguida, utilizando enzimas do tipo  $\alpha$ -amilases para uma hidrólise enzimática controlada, ocorre a formação específica dos maltooligossacarídeos. É importante destacar que o tipo de  $\alpha$ -amilase utilizada no processo de formação da molécula de oligossacarídeo, irá determinar o tamanho da cadeia de maltooligossacarídeo, de acordo com sua especificidade (CRITTENDEN; PLAYNE, 1996). De forma semelhante ocorre a produção dos isomaltooligossacarídeos. No entanto, os resíduos glicosídicos utilizados para formação da molécula são [ $\alpha$ -D-Gli-(1 $\rightarrow$ 6)-]. Além disso, as misturas desses oligossacarídeos também contém resíduos do tipo  $\alpha$ (1 $\rightarrow$ 4). Sua produção utiliza enzimas imobilizadas em um reator de dois estágios. No primeiro estágio,  $\alpha$ -amilases (E.C. 3.2.1.1) atuam na liquefação do amido para ser usado no segundo estágio. Nessa etapa, duas reações estão envolvidas: na primeira, catalisada pela  $\beta$ -amilase (E.C. 3.2.1.2), ocorre a hidrólise o amido liquefeito, produzindo maltose para ser utilizado na segunda reação, catalisada por  $\alpha$ -glicosidase (E.C. 3.2.1.20), ocorrendo uma reação de transglicosidação para a formação da molécula de isomaltooligossacarídeo.

Outro tipo de oligossacarídeo produzido utilizando lactose com substrato é a lactosacarose. Seu processo de produção utiliza sacarose e a mesma enzima usada na produção de frutooligossacarídeos ( $\beta$ -frutofuranosidase – E.C. 3.2.1.26). O resíduo [ $\beta$ -D-Gal-(1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -D-Gli-(1 $\rightarrow$ 2)-] proveniente da lactose é ligado a resíduos frutósidos ( $\beta$ -D-Fru), formados também pela ação da enzima  $\beta$ -frutofuranosidase, a qual também catalisa a reação de transfrutossilção para a formação da molécula de lactosacarose (CRITTENDEN; PLAYNE, 1996; DUARTE *et al.*, 2017; GUERRERO; ILLANES, 2016).

Dentre os oligossacarídeos citados, a rafinose e a estaquiase são os únicos que podem ser obtidos apenas por extração direta da fonte vegetal, sem a necessidade de enzimas durante o processo de produção (JOHNSON *et al.*, 2013; XI *et al.*, 2021; ZHAO, Yue Tao *et al.*, 2013). A extração é feita a partir de uma solução de soro de soja, obtida com subproduto da produção da proteína de soja isolada e concentrada, que possui um alto teor de rafinose e estaquiase, além de açúcares mais simples, como sacarose, glicose e frutose. Em geral, os processos de extração desses carboidratos podem ser utilizando água ou soluções aquosas de álcoois como, por exemplo, metanol e etanol. A extração utilizando apenas água é a mais indicada para separar açúcares de baixo peso molecular, como o caso da rafinose. Todavia, a

água também é um solvente bastante indicado na extração de componentes hidrofílicos, tais como polissacarídeos e proteínas que também estão presentes na composição de fontes vegetais. Outro ponto importante é que enzimas como  $\alpha$ -amilases (E.C. 3.2.1.1) e  $\alpha$ -galactosidades (E.C. 3.1.2.22), presentes nas células vegetais, devem ser inativadas antes, ou até mesmo durante o processo de extração, sendo que o uso da água como solvente não permite tal inativação enzimática. Por esses motivos, os processos de extração mais recomendados e utilizados comercialmente, fazem uso de sistemas aquosos alcoólicos, com um teor de aproximadamente 80 % (v/v) de metanol ou etanol para remoção da rafinose. A empresa japonesa *Calpis Food Industry Co.* foi pioneira no processo de obtenção de oligossacarídeos da soja, dentro os quais, a rafinose (AL-SHERAJI *et al.*, 2013; JOHANSEN; GLITSØ; BACH KNUDSEN, 1996; MUSSATTO; MANCILHA, 2007).

Por fim, a lactulose também faz parte dos principais oligossacarídeos com interesse comercial. No entanto, diferente da rafinose, não pode ser encontrada naturalmente. Em geral, seu processo de produção é através de isomerização alcalina da lactose, utilizando rotas reacionais de *Lobry de Bruyn-van Ekenstin* (ANGYAL, 2001; WANG, Zerong, 2010). A rota de produção química da lactulose em meio alcalino é a mais empregada, utilizando como catalisadores básicos hidróxido de cálcio, hidróxido de sódio, hidróxido de potássio, carbonato de potássio, aluminatos de sódio, aminos terciários, boratos, zeólitas e sepiolites (AIDER; HALLEUX, 2007; DE ALBUQUERQUE *et al.*, 2018; WANG, Zerong, 2010).

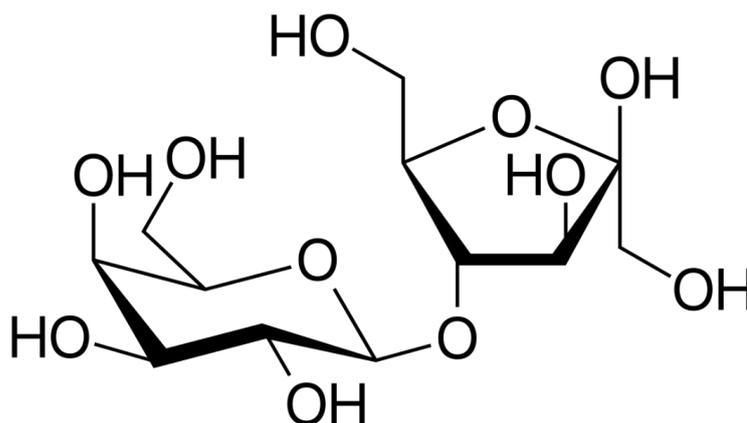
A grande problemática da síntese química na produção de lactulose é a geração de níveis elevados de subprodutos e resíduos monossacarídicos (como glicose, galactose e frutose), presentes no xarope de lactulose produzido e que não são facilmente separados. Em termos de produção comercial, a contaminação do produto final deve ser evitada, o que faz com que um processo de purificação eficaz da lactulose produzida seja necessário. Tais processos são caros e geram resíduos com altas cargas orgânicas, que também demandam uma atenção especial ao seu tratamento e geram mais custos ao processo (GUERRERO; VERA; CONEJEROS; *et al.*, 2015; GUERRERO; ILLANES, 2016). No entanto, a produção enzimática da lactulose, mesmo que ainda pouco utilizada em níveis industriais, vem sendo alvo de estudos, justamente por se tratar de um processo que não requer substratos puros e que gera um produto final com maior grau de pureza, com um efluente com níveis inferiores de subprodutos (DE ALBUQUERQUE *et al.*, 2018; GUERRERO *et al.*, 2019; GUERRERO; VERA; ILLANES, 2017b; SCHMIDT; NEDELE; HINRICHS, 2020).

Como um dos objetivos do presente estudo é a produção de lactulose, o tópico a seguir traz uma série de informações acerca de suas características, formas de obtenção e benefícios que ela proporciona.

### 3.5 Lactulose

A lactulose (Figura 2) (4-O-β-D-galactorpiranosil-D-frutose) é um dos tipos de oligossacarídeos que tem despertado a atenção de estudos voltados para sua produção, devido às suas propriedades terapêuticas, sendo considerado um importante composto produzido a partir da lactose (WANG, He *et al.*, 2013). A Tabela 3 apresenta as principais propriedades físico-químicas da lactulose.

Figura 2 – Estrutura molecular da lactulose.



Fonte: O Autor (2021).

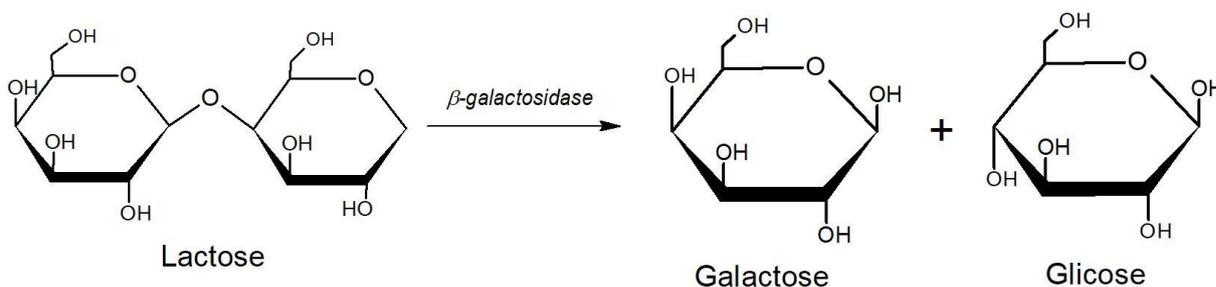
Tabela 3 – Propriedades físico-químicas da lactulose.

<b>Fórmula molecular</b>	C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>
<b>Massa molecular (g/mol)</b>	342,3
<b>Ponto de fusão (°C)</b>	168,5 – 170
<b>Calor de solução (J/g)</b>	-11,68
<b>Rotação específica [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> a 589 nm</b>	-51,5 °
<b>Doçura (em relação a sacarose)</b>	0,6 – 0,8
<b>Solubilidade em água a 20 °C (g/L)</b>	2060
<b>Solubilidade em etanol a 30 °C (g/L)</b>	25,4
<b>Temperatura de transição vítrea (T<sub>g</sub>, °C)</b>	-47

Fonte: Nooshkam, Babazadeh, & Jooyandeh (2018).

Inicialmente, a presença de lactulose foi definida com um parâmetro de qualidade do leite, identificando se o procedimento térmico utilizado foi UHT (*Ultra-High Temperature*), UHT indireto, esterilização ou pasteurização. Nesse caso, a lactulose funcionava com um indicador químico, o qual variava de acordo com a concentração de lactulose presente no leite, mostrando se o tratamento havia sido eficaz ou não (ADACHI, 1965, 1958). A primeira forma de obtenção de lactulose por via enzimática foi demonstrada por Vaheri e Kaupinnen (1978), os quais realizaram uma reação de hidrólise da lactose catalisada pela enzima β-galactosidase, na presença de frutose (Figura 3).

Figura 3 – Esquema de hidrólise da lactose por rota enzimática, utilizando β-galactosidases como biocatalisadores da reação.

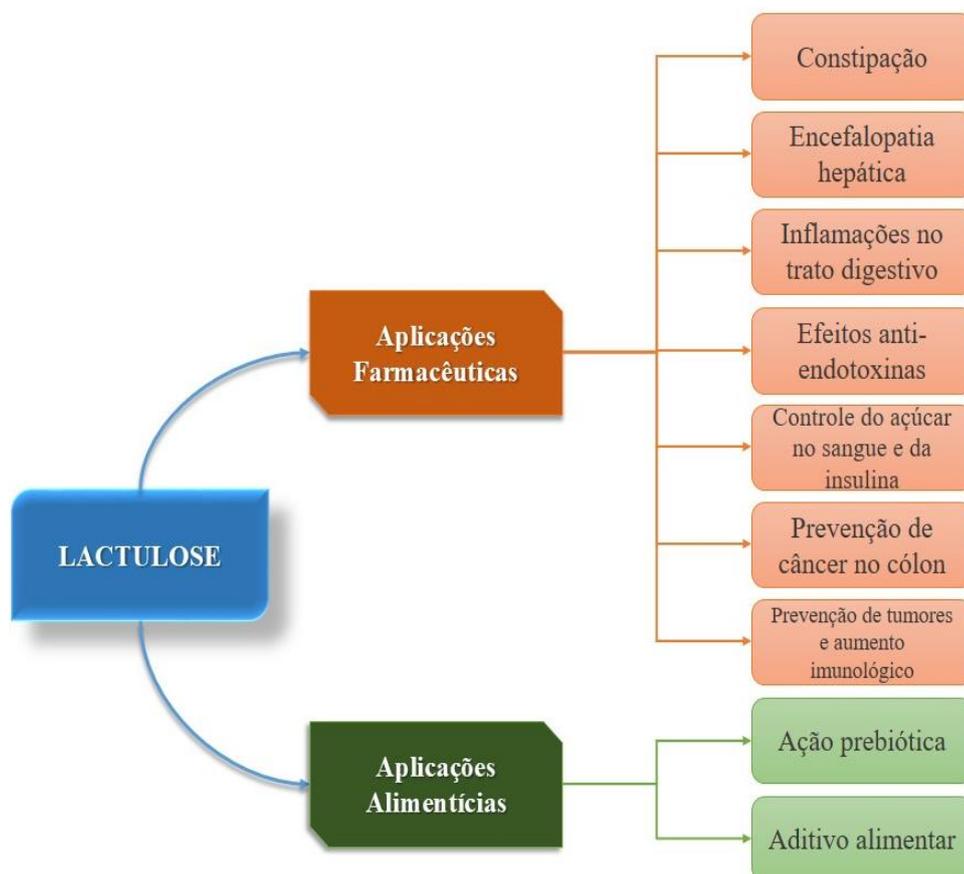


Fonte: O Autor (2021).

As enzimas presentes no trato digestivo dos mamíferos não são capazes de hidrolisar a ligação *o*-glicosídica entre a galactose e frutose que compõem a lactulose (PANESAR, P. S.; BALI, 2015; SCHUSTER-WOLFF-BÜHRING; FISCHER; HINRICHS, 2010), o que faz com que esse composto chegue ativo e em quantidade suficiente para ser utilizado por espécies de *Bifidobacterium* presentes na flora intestinal. A lactulose consumida por esses microrganismos faz com que ocorra um aumento na produção de ácido acético, láctico e fórmico, bem como um aumento na produção de dióxido de carbono. Esses compostos agem bioquimicamente no organismo, atraindo uma maior quantidade de fluidos para as regiões intestinais, alterando a consistência das fezes, tornando-as menos consistentes e facilitando sua excreção. Além disso, uma maior quantidade desses ácidos faz com que o conteúdo presente no intestino se torne mais ácido, reduzindo a absorção de compostos químicos derivados da amônia (PANESAR, Parmjit S.; KUMARI, 2011).

Diversas são as aplicações para lactulose, tanto no ramo alimentício quanto no setor farmacêutico. A Figura 4 apresenta um esquema com as diversas aplicações da lactulose.

Figura 4 – Aplicações da lactulose no setor farmacêutico e no setor alimentício.



Fonte: Adaptado de Guerrero & Wilson, (2016).

### 3.5.1 Aplicações da lactulose

Desde 1950, a lactulose já vem sendo utilizada pelo setor farmacêutico como medicamento para o tratamento de doenças e alterações na saúde. Seus efeitos prebióticos foram descobertos em 1957, em bactérias do gênero *Bifidus*, fazendo com que surgisse um interesse por parte do setor alimentício (NOOSHKAM; BABAZADEH; JOOYANDEH, 2018).

Desde a década de 60 que a lactulose é utilizada com medicamento para tratar constipação. Essa aplicação médica se dá devido à formação de compostos ácidos de baixo peso molecular, que aumentam os efeitos osmóticos intestinais, aumentando o fluxo de água resultante para o cólon e reduzindo o pH fecal. Isso faz com que ocorra um aumento na motilidade fecal (ou seja, facilidade de locomoção), amolecimento das fezes e uma redução do tempo de trânsito colônico (NOOSHKAM; BABAZADEH; JOOYANDEH, 2018). Contudo, a extensão dos efeitos purgativos irá depender de fatores como idade, peso, sexo, estado da saúde e a dieta do paciente em questão. Além disso, o seu uso pode promover benefícios contra a constipação crônica, devido ao seu perfil de segurança no uso de longo prazo e a eficácia comprovada da lactulose (SCHUMANN, 2002).

Estudos mostram que o uso da lactulose curou os sintomas neuropsiquiátricos da encefalopatia (NOOSHKAM; BABAZADEH; JOOYANDEH, 2018; PANESAR, Parmjit S.; KUMARI, 2011). A encefalopatia hepática, em geral, ocorre em pacientes já diagnosticados com alguma doença hepática crônica, como cirrose ou algum tipo de hepatite. Os principais fatores desencadeantes desta doença são infecções e desidratação. Seus sintomas consistem em esquecimento, confusão mental, hálito com odor desagradável e bolorento, desorientação e fala arrastada (KARANFILIAN; PARK; SENATORE, 2020). A toxina mais comum e que acarreta esse tipo de complicação é a amônia, produzida pela degradação de proteínas por bactérias intestinais. Quando não removida do sangue por ação do fígado, atua como um composto neurotóxico (SCHUMANN, 2002). Em geral, o tratamento é realizado por meio da redução no consumo de proteínas e com o uso de antibióticos. No entanto, tais condições podem ser substituídas pelo uso da lactulose.

A fermentação de lactulose por bactérias presentes no trato intestinal produz quantidades significativas de hidrogênio endógeno mobilizado, que pode ser utilizado como protetor contra colite induzida por DSS (*Dextran Sulfate Sodium*, em português sulfato de dextrano sódico), reduzindo o estresse oxidativo e aliviando os sintomas de doenças inflamatórias intestinais em seres humanos. Além disso, a ingestão oral de lactulose evita a

endotoxemia sistêmica de origem intestinal. Assim, a lactulose previne inflamações intestinais, já que evita a proliferação de bactérias que liberam endotoxinas que são a causa da patogênese dessa doença (PANESAR, Parmjit S.; KUMARI, 2011).

A lactulose pode prevenir efeitos de endotoxinas como, por exemplo, disfunções renais (DIAMOND; ROWLANDS, 1989; KOUTELIDAKIS *et al.*, 2003). Outros benefícios obtidos a partir desses efeitos são aplicações médicas em tratamentos de doenças metabólicas como síndrome hepatorenal (SCHUSTER-WOLFF-BÜHRING; FISCHER; HINRICHS, 2010), disfunções pancreáticas exócrinas (MACK, D R *et al.*, 1990; MACK, David R. *et al.*, 1992), diabetes *mellitus* (TABATABAIE, Tahereh *et al.*, 1997) e hipercolesterolemia (LIAO, W.; FLOREN, 1994; LIAO, Wei; FLORÉN, 1993).

Reportes (CORNELL, 1985) sugerem que a lactulose possui efeitos anti diabetes devido aos efeitos anti-endotoxinas afetarem a produção de insulina pelo organismo. Dessa forma, com um controle sob a produção de insulina ocorre um controle subsequente dos níveis de glicose no sangue (BIANCHI, G. P. *et al.*, 1994; BIANCHI, G.; RONCHI; MARCHESINI, 1997; CORNELL, 1985).

Estudos mostram que o uso da lactulose curou os sintomas neuropsiquiátricos da encefalopatia (NOOSHKAM; BABAZADEH; JOOYANDEH, 2018; PANESAR, Parmjit S.; KUMARI, 2011). O câncer de cólon ocorre em consequência de processos bioquímicos que podem acontecer no lúmen, nos mucos ou em tecidos adjacentes a essa região. Os produtos resultantes do metabolismo da microflora colônica, bem como sua composição, influenciam diretamente na formação de células cancerígenas na região colônica. A lactulose aliada à bactérias probióticas também presentes nessa região, reduzem os riscos de câncer de cólon (LIONG, 2008; WOLLOWSKI; RECHKEMMER; POOL-ZOBEL, 2001).

A ingestão de lactulose favorece o desenvolvimento de bactérias do gênero *Bifidus*. Essas bactérias desempenham um papel importante na prevenção de tumores e no desenvolvimento imunológico do hospedeiro (PANESAR, Parmjit S.; KUMARI, 2011; SCHUMANN, 2002).

As principais aplicações da lactulose no setor alimentícios estão relacionadas com o seu fator bífido ou com aplicações como ingrediente funcional para regularização intestinal. Além disso, a lactulose pode ser utilizada na modificação de sabor e de propriedades físico-químicas de alimentos. Este dissacarídeo pode ser utilizado como adoçante para pacientes diabéticos e como substituto do açúcar em bebidas, leite em pó, iogurtes, sobremesas lácteas,



O mecanismo de reação da rota química segue transformações que ocorrem por meio de reações de *Lobry de Bruyn-van Ekenstin* (ANGYAL, 2001; WANG, Zerong, 2010). As reações de *Lobry de Bruyn-van Ekenstin* se dividem basicamente em duas: epimerização e interconversão de aldoses a cetoses, as quais ocorrem de forma paralela e simultânea (HAJEK *et al.*, 2013), sendo a segunda reação mais importante. Tais reações ocorrem em meio alcalino (ou com algum catalisador básico), sendo que qualquer material que possua características alcalinas pode ser usado nesse tipo de reação. Contudo, a reação apresenta um equilíbrio termodinâmico desfavorável e uma baixa seletividade às cetoses reativas formadas durante o processo de interconversão. Como alternativa para contornar esse problema, é comum utilizar-se agente de complexação (como o borato) que irão atuar com estabilizadores das cetoses, facilitando a conversão molecular. No entanto, o uso desses agentes contribui para formação de efluentes com uma maior carga de resíduos e dificulta o processo de purificação e separação do produto final (HAJEK *et al.*, 2013; MENDICINO, 1960).

Há também uma segunda rota química de obtenção de lactulose, que consiste numa reação de lactose com amônia ou aminas. Neste caso, ocorre a formação de um complexo lactosilamina, o qual sofre um rearranjo molecular conhecido como reagrupamento de Amadori (HOJNIK *et al.*, 2016), para formação de lactusolamina e, após isso, ocorre a hidrólise para formação de lactulose.

Um dos fatores essenciais no processo de produção de lactulose (seja por via química ou biológica) é a presença de nucleófilos (tais como a frutose, por exemplo). No caso da síntese química, esses podem ser obtidos por meio de diversos agentes que possuam e confirmam ao meio (após dissolução) propriedades básicas. Isto traz uma noção de que não existe ainda o catalisador ideal para tal reação. Todavia, o catalisador utilizado deve seguir alguns critérios (AIDER; HALLEUX, 2007).

- i. Garantir um nível máximo de isomerização com baixos níveis de formação de subprodutos;
- ii. Ser ambientalmente seguro e não possuir toxicidade;
- iii. Ser facilmente removido do meio através de processos de desmineralização;
- iv. Possuir baixo custo e alta disponibilidade;
- v. Possuir uma boa estabilidade operacional para usos sucessivos.

Contudo, não estão disponíveis reportes sobre um catalisador que alie todos esses parâmetros, apresentando pontos positivos e negativos, e os catalisadores alcalinos mais

utilizados nesse tipo de síntese se dividem em três principais grupos: os hidróxidos, sulfatos e boratos (AIDER; HALLEUX, 2007; HAJEK *et al.*, 2013; PANESAR, Parmjit S.; KUMARI, 2011). Ao analisar o processo de produção de lactulose por isomerização em meio alcalino, percebem-se desvantagens, sendo a maioria relacionada com o processo de *downstream*.

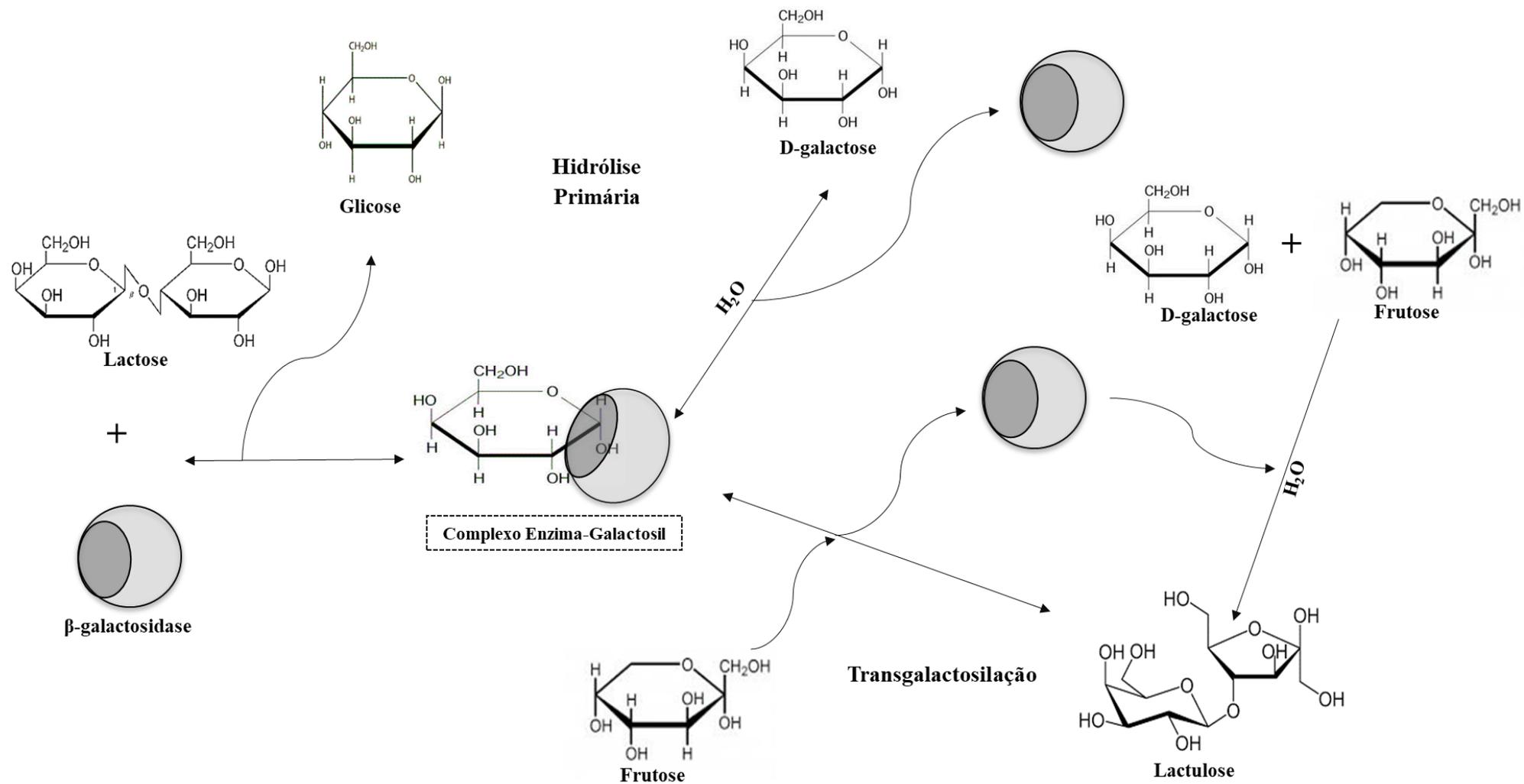
### 3.7 Processo de produção de lactulose por rota enzimática

O uso de uma rota enzimática como alternativa para esse processo já mostrou resultados eficazes para transpor os problemas causados pela via química de produção (GIBSON; RASTALL, 2012; LEE; KIM; OH, 2004; PADILLA *et al.*, 2015).  $\beta$ -galactosidases (E.C. 3.2.1.23) são as enzimas mais utilizadas na síntese de lactulose por via enzimática, devido à sua robustez e ao seu amplo uso na indústria alimentícia em processos de hidrólise de lactose para produção de leite com baixo teor de lactose e até mesmo em tratamentos dos efluentes gerados por esse setor (GUERRERO; WILSON, 2016). Essas enzimas hidrolisam a ligação  $\beta$ -1,4-D-galactosídica da lactose, liberando seus monossacarídeos, glicose e galactose (WANG, He *et al.*, 2013). Na presença de substratos, como lactose e frutose e sob as condições apropriadas, a  $\beta$ -galactosidase irá catalisar a hidrólise da lactose, liberando glicose e galactose no meio. Esta última irá formar o complexo enzima-galactosil, o qual, na presença de frutose (que age como nucleófilo), irá formar a molécula de lactulose, podendo gerar até mesmo outros galactooligossacarídeos (dependendo da molécula que irá atuar como nucleófilo na reação de transgalactosilação), sem perder sua eficiência na hidrólise da lactose (PANESAR, P. S.; BALI, 2015; PANESAR, Parmjit S.; KUMARI, 2011). Nessas reações, o nucleófilo ataca o complexo enzima-substrato para formar o produto desejado. Ocorre que, tanto a frutose (no caso das reações de formação de lactulose) quanto a água (nas reações de hidrólise) podem atuar como nucleófilo, gerando uma espécie de competição entre as reações catalisadas pela  $\beta$ -galactosidase. Dessa forma, tem-se tanto uma reação controlada cineticamente (a transgalactosilação), quanto uma reação controlada termodinamicamente (a hidrólise). A síntese de lactulose, por ser cineticamente controlada, pode ser favorecida retirando-se o produto, no caso a lactulose, do meio ao longo da reação, pois existe uma concentração ideal de lactulose que deve estar presente no meio, a fim de que a transgalactosilação prevaleça sobre a hidrólise. Além do controle sobre a quantidade de lactulose no meio, a concentração do nucleófilo também é algo que altera o balanço entre essas duas reações, e que deve ser levado em conta nesses estudos (BOON; VANT RIET; JANSSEN, 2000).

O processo de produção de lactulose por via enzimática torna a reação mais seletiva e necessita de condições reacionais mais suaves, quando comparadas à rota química, fazendo com que o processo torne-se mais adequado aos princípios da química verde e o produto final gerado seja mais puro, otimizando o processo de *downstream* (GUERRERO *et al.*, 2011). O uso de rotas biológicas permite utilizar substratos não-puros como fonte de lactose. É o caso do soro de leite, sendo um resíduo da produção de queijos e que é comumente utilizado nesse tipo de processo (CASAL *et al.*, 2006; KOUTINAS *et al.*, 2009; NOOSHKAM; BABAZADEH; JOOYANDEH, 2018; PINHEIRO ALVES *et al.*, 2014; RAMOS *et al.*, 2015). Além desses fatores, rotas bioquímicas permitem a geração de efluentes com uma menor quantidade de contaminantes em sua composição, ou seja, a formação de subprodutos indesejáveis é bastante reduzida nesses casos de reações bioquímicas.

É necessário entender como funciona a síntese de lactulose por via enzimática, para analisar possíveis condições para otimizar este processo. Na rota biológica (Figura 6), a formação da molécula de lactulose ocorre através da formação de uma ligação *o*-glicosídica entre o complexo  $\beta$ -galactosil e o átomo de carbono C<sub>4</sub> da molécula de frutose (WANG, He *et al.*, 2013). Esse tipo de reação pode ser catalisada por  $\beta$ -galactosidases, e em alguns casos, por  $\beta$ -glicosidases (PANESAR, Parmjit S.; KUMARI, 2011; WANG, He *et al.*, 2013). Essas enzimas atuam tanto no processo de hidrólise da lactose, quanto no processo para formação da lactulose, catalisando a reação de transgalactosilação para a formação deste prebiótico (Figura 6).

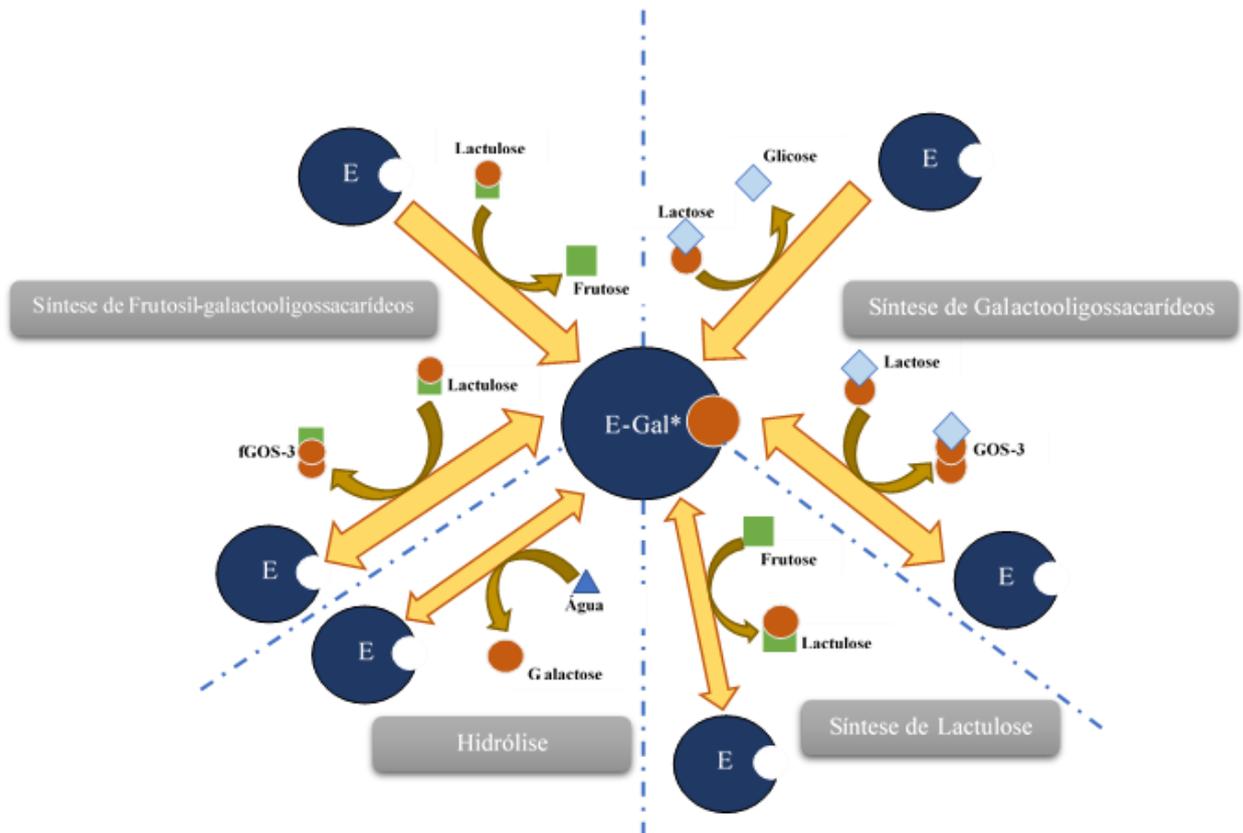
Figura 6 – Reações de hidrólise da lactose e síntese de lactulose por transgalactosilação, catalisadas por  $\beta$ -galactosidase.



Fonte: Albuquerque (2018).

Essa reação pode ocorrer por duas vias diferentes: uma via termodinamicamente controlada e outra cineticamente controlada. Na primeira via, a síntese de lactulose é termodinamicamente controlada, o que favorece a ocorrência de uma hidrólise reversa, na qual os açúcares que compõem a lactulose irão atuar ambos como substrato. Nesse caso, moléculas de água atuam como receptores galactosil, e glicose e galactose surgem como produtos finais. É comum nesse tipo de reação o uso de receptores galactosil fixos (um único tipo de molécula, como a água, por exemplo), fazendo com que o rendimento da reação dependa apenas de sua termodinâmica. Na segunda via, a formação de lactulose é cineticamente controlada. Aqui, a enzima transfere uma unidade de monossacarídeo, a partir do doador acil, para outro sacarídeo, o qual é o receptor de monossacarídeos (aceptor acil). Esse tipo de reação é observado quando o objetivo do processo é favorecer a transgalactosilação, existindo uma dependência cinética relacionada aos substratos e ao biocatalisador utilizado. Dessa forma, por ser uma etapa conduzida pela atividade de transgalactosilação da  $\beta$ -galactosidase, o processo de produção de lactulose é cineticamente controlado, sendo que a lactose atua como doador acil ativo e a frutose como nucleófilo (receptor acil ativo) (DE ALBUQUERQUE *et al.*, 2018). Moléculas de frutose, glicose, lactose entre outras, podem atuar como receptores galactosil e formam moléculas de lactulose, galactooligossacarídeos e outros oligossacarídeos (MAYER *et al.*, 2004; SITANGGANG; DREWS; KRAUME, 2014b). A Figura 7 apresenta algumas possibilidades de reações com o complexo  $\beta$ -galactosil com diferentes nucleófilos.

Figura 7 – Representação esquemática das diferentes reações que envolvem o complexo enzimático  $\beta$ -galactosil com diferentes tipos de nucleófilos.



Fonte: Adaptado de Guerrero, Vera, & Illanes (2017a).

Durante os ensaios de otimização do processo de produção de lactulose por rota biológica, observou-se que outros tipos de oligossacarídeos também foram sintetizados durante a reação: a rafinose e a estaquiase. Dessa forma, procurou-se conhecer um pouco mais sobre esses compostos, a fim de se avaliar o processo de produção conjunta desses oligossacarídeos com a lactulose, em uma mesma reação.

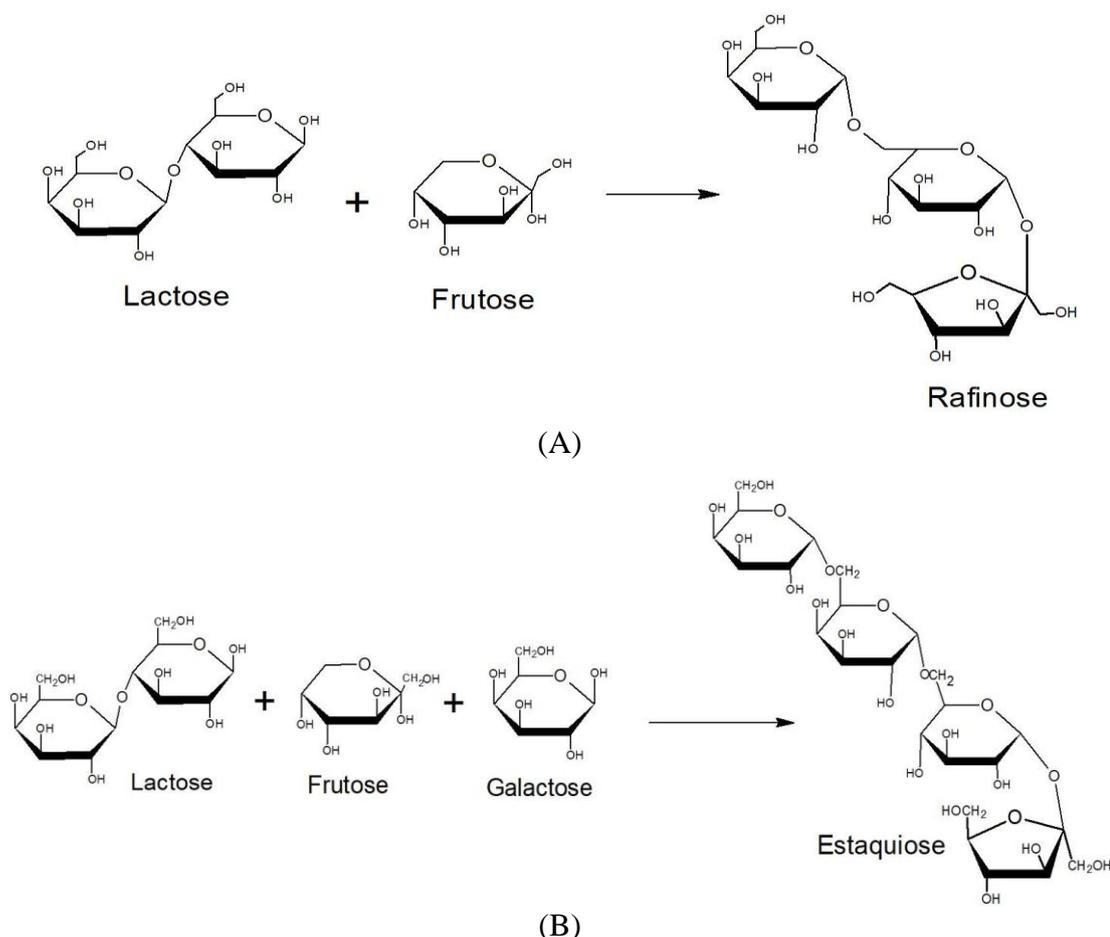
### 3.7.1 Rafinose e estaquiase

Considerados como oligossacarídeos da família da rafinose, a estaquiase ( $\alpha$ -D-galactopiranosil-(1 $\rightarrow$ 6)- $\alpha$ -D-galactopiranosil-(1 $\rightarrow$ 6)- $\alpha$ -D-glicopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-frutopiranosil e a rafinose ( $\alpha$ -D-galactopiranosil-(1 $\rightarrow$ 6)- $\alpha$ -D-glicopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-frutopiranosil) são amplamente encontrados no reino vegetal, mais precisamente em espécies leguminosas (JOHNSON *et al.*, 2013; KURIYAMA; MENDEL, 1917; XI *et al.*, 2021; ZHU, Xin *et al.*, 2020). Tais compostos são produzidos durante a fase de desenvolvimento da semente

e funcionam como reservas de carbono durante a fase de amadurecimento e germinação da planta (HERNANDEZ-HERNANDEZ *et al.*, 2011; MARTÍNEZ-VILLALUENGA; FRÍAS; VIDAL-VALVERDE, 2005). Devido ao seu baixo peso molecular, esses oligossacarídeos podem ser encontrados em diferentes sementes pertencentes ao grupo das oleaginosas. As sementes de tremoço possuem um alto teor desses oligossacarídeos em sua composição (aproximadamente 7-15 %) (MARTÍNEZ-VILLALUENGA; FRÍAS; VIDAL-VALVERDE, 2005).

Da mesma forma que os demais oligossacarídeos, a rafinose e a estaquiose resistem ao processo digestivo, chegando em quantidades significativas em regiões específicas do trato intestinal, atuando no crescimento seletivo e melhorando a atividade de bactérias do gênero *Bifidus*, presentes no cólon e benéficas ao hospedeiro (PANESAR, P. S.; BALI, 2015; TAKAHASHI *et al.*, 2005; VORAGEN, 1998). No entanto, diferentemente da lactulose, a qual é classificada com um dissacarídeo formado por uma molécula de galactose e um de frutose, a rafinose é um trissacarídeo, formado por glicose, frutose e galactose e a estaquiose um tetrassacarídeo, composto por duas moléculas de galactose, uma de glicose e uma de frutose. A Figura 8 apresenta um esquema da composição da rafinose e da estaquiose.

Figura 8 – Estrutura molecular dos compostos envolvidos na formação da molécula de rafinose (A) e na molécula de estaquiose (B).



Fonte: O Autor (2021).

Por se tratarem de carboidratos de baixo peso molecular, tais compostos são facilmente extraídos utilizando água como solvente. No entanto, tal extração não garante um grau de pureza adequado, pois a água também dissolve outros tipos de carboidratos presentes na composição vegetal, além de proteínas e fibras polissacarídeas (DESAI *et al.*, 2020; MUSSATTO; MANCILHA, 2007). Por esse motivo, o método mais utilizado na extração desses compostos é com soluções com alto teor de álcoois (JOVANOVIC-MALINOVSKA; KUZMANOVA; WINKELHAUSEN, 2015; MUSSATTO; MANCILHA, 2007). Nesse tipo de extração, ocorre que polímeros com grau de polimerização maior que 20, serão precipitados, não interferindo na solubilização de outros carboidratos, como o caso da rafinose e da estaquiose, os quais não precipitam nesse tipo de extração (JOHANSEN; GLITSØ; BACH KNUDSEN, 1996; JOVANOVIC-MALINOVSKA; KUZMANOVA; WINKELHAUSEN, 2015). Além disso, o uso de métodos de extração com solventes alcoólicos inativa a enzima  $\alpha$ -

galactosidase, presente nos organismos vegetais, e que pode alterar a estrutura dos oligossacarídeos presentes na amostra. Nesses casos, percentuais de aproximadamente 80 % v/v de metanol ou etanol, são interessantes para esse tipo de extração. Contudo, soluções com teor alcóolico de 50 % são mais interessantes de serem utilizadas para extração em leguminosas mais maduras e, conseqüentemente, com maior teor desses oligossacarídeos (60-90 %) (GULEWICZ *et al.*, 2000).

Em se tratando de rotas biológicas para produção desses compostos, ainda não há uma quantidade significativa de trabalhos que demonstrem uma produção enzimática para esses compostos, mostrando que tal área de pesquisa necessita de estudos para o seu desenvolvimento. Em geral, as rotas enzimáticas mencionadas em estudos envolvendo a rafinose e a estaquiase, tem relação com a hidrólise desses compostos utilizando  $\alpha$ -galactosidases (E.C. 3.2.1.22), com o intuito de reduzir os teores desses oligossacarídeos principalmente em rações a base de soja, visando minimizar a produção de gases no processo de digestão (ZHU, Xin *et al.*, 2020). Isso ocorre devido à ausência dessa enzima ( $\alpha$ -galactosidase) no trato digestivo animal, fazendo com que esses oligossacarídeos se acumulem no intestino grosso e sirvam de substrato para microrganismos anaeróbicos, os quais, como resultado da fermentação desses compostos, levam a uma maior quantidade de gases formados dentro do trato intestinal (MARTÍNEZ-VILLALUENGA; FRÍAS; VIDAL-VALVERDE, 2005).

Os benefícios obtidos com a ingestão desses oligossacarídeos têm relação com a proliferação de microrganismos benéficos para o trato intestinal, os quais agem aumentando a imunidade dessa região e auxiliando no controle de problemas associados à hipertensão, constipação, cólicas e à obesidade (GIBSON *et al.*, 2004). Em geral, os produtos finais do metabolismo da rafinose e da estaquiase por esses microrganismos específicos, são ácidos graxos de cadeia curta (ÍSPIRLI *et al.*, 2021). Sørensen e colaboradores (2011) avaliaram os efeitos que a rafinose e a estaquiase na dieta de salmões do Atlântico, observando que a ingestão desses oligossacarídeos de forma combinada ou isoladamente não teve efeitos significativos sobre a digestão de proteínas e gorduras, mas trouxe mudanças morfológicas na microbiota presente no trato intestinal dos animais (SØRENSEN *et al.*, 2011). Yang e colaboradores (2018) avaliaram os efeitos da ingestão de estaquiase por linguados da espécie *Scophthalmus maximus*. Os resultados obtidos pelos autores mostraram que a ingestão desse composto trouxe benefícios ao trato intestinal dos espécimes analisados, além de melhorar a função da mucosa gástrica, a

qual atua diretamente na proteção da parede intestinal contra a ação de enzimas presentes no processo digestivo (YANG *et al.*, 2018).

Peterbauer e colaboradores (2001) avaliaram a produção de estaquiiose por meio do alongamento da cadeia de moléculas de rafinose extraídas de sementes de ervilha. Para tal, os autores isolaram uma enzima presente nas sementes de ervilha, a estaquiiose-sintase (E.C. 2.4.1.67), para utilizá-la como biocatalisador para formação da molécula de estaquiiose, a partir da rafinose presente na composição da semente, mais uma molécula de galactose. Nesse estudo, os autores se preocuparam em avaliar a atividade enzimática e tentar otimizá-la através de técnicas de manipulação genética, mostrando a necessidade de trabalhos voltados para área de produção desses oligossacarídeos (PETERBAUER *et al.*, 2002).

Zhao e colaboradores (2013) avaliaram a síntese de rafinose e estaquiiose utilizando uma rota química de produção, na qual utilizaram o catalisador  $\text{Co}_2(\text{CO})_8/\text{Et}_3\text{SiH}/\text{CO}$ . O princípio de uso dessa catalisador a base de cobalto e silício é agir como uma espécie de agente protetivo dos grupamentos hidroxila presentes nas moléculas dos carboidratos constituintes da rafinose e da estaquiiose, facilitando a formação das ligações glicosídicas entre os monossacarídeos constituintes dessas moléculas maiores. No entanto, os autores se preocupam em otimizar o catalisador gerado, sem apresentar resultados de produção dos compostos apresentados (ZHAO, Yue Tao *et al.*, 2013).

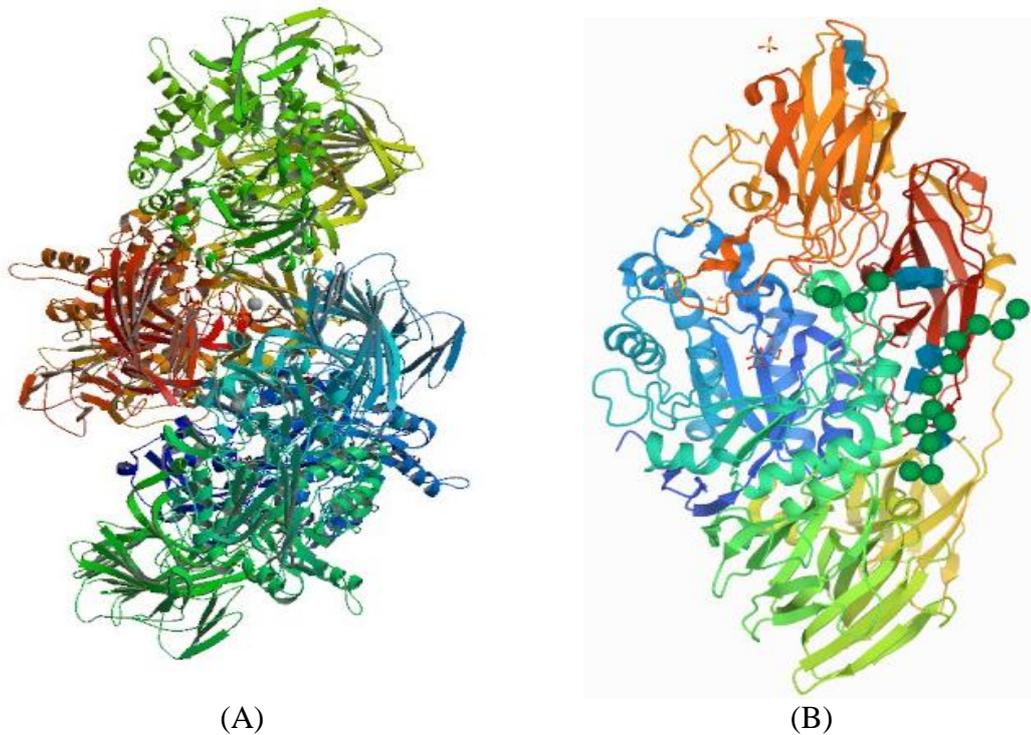
Tais trabalhos indicam que ainda existe um déficit expressivo em estudos que apontem processos de produção da rafinose e da estaquiiose mais precisos e eficientes. Isso mostra que essa área é um possível campo de interesse e desenvolvimento de novos estudos, em especial, voltados para o desenvolvimento de bioprocessos, como os apresentados no presente trabalho.

### 3.8 $\beta$ -galactosidases

A  $\beta$ -galactosidase (EC 3.2.1.23) é uma enzima comumente produzida por diversos microrganismos, mas que apenas um percentual pode ser utilizado de maneira eficaz em bioprocessos, sendo mais comum o uso dessa enzima obtida de microrganismos do gênero *Kluyveromyces* e *Aspergillus* (GUERRERO; WILSON, 2016). A síntese de lactulose por via enzimática alcançou uma maior notoriedade a partir do momento em que  $\beta$ -galactosidases passaram a ser comercializadas como produtos após obterem o *status* GRAS (em inglês: *Generally Recognized As Safe*), concedido pela *Food and Drug Administration* (FDA), órgão

do *Department of Health and Human Services* dos Estados Unidos, responsável pelo controle de alimentos e medicamentos, através de testes e pesquisas (GUERRERO; WILSON, 2016). Em enzimas obtidas a partir de microrganismos do gênero *Kluyveromyces*, observa-se melhores resultados na reação de hidrólise do que na reação de transgalactosilação, já que o sítio ativo necessário para catalisar esse tipo de reação é mais disponível na enzima obtida dessa cepa. Já no caso de  $\beta$ -galactosidases obtidas de microrganismos do gênero *Aspergillus*, observa-se um melhor rendimento nas reações de transgalactosilação, provavelmente devido a mesma questão de disponibilidade de sítios ativos, observada nas enzimas de *Kluyveromyces* (PEREIRA-RODRÍGUEZ *et al.*, 2012). Diferentes microrganismos geram diferentes variações da mesma enzima, favorecendo ou desfavorecendo determinado tipo de reação. Entender essas nuances e particularidades de cada biocatalisador é um ponto importante quando se quer avaliar ou propor um bioprocesso. A Figura 9 apresenta a estrutura de  $\beta$ -galactosidases de *Kluyveromyces lactis* e de *Aspergillus niger*.

Figura 9 – Estrutura dimensional de  $\beta$ -galactosidases de (A) *Kluyveromyces lactis* e (B) *Aspergillus niger*.



Fonte: PDB (2020).

$\beta$ -galactosidases obtidas de *Aspergillus oryzae*, e de *Kluyveromyces lactis*, foram as que apresentaram melhores rendimentos em reações de hidrólise e transgalactosilação. No entanto, as enzimas provenientes de cepas de *A. oryzae* apresentaram melhores rendimentos em processos de produção de oligossacarídeos, sendo as que mais são usadas em trabalhos dessa natureza (GUERRERO; VERA; CONEJEROS; *et al.*, 2015). Além disso, os trabalhos que envolvem a produção de lactulose e oligossacarídeos, em geral, não utilizam a enzima proveniente de *K. lactis*, indicando uma necessidade de se aprofundar os estudos envolvendo a  $\beta$ -galactosidase oriunda dessa cepa.

Levando-se em conta a enzima utilizada no presente estudo,  $\beta$ -galactosidases de *Kluyveromyces lactis* são formadas por oligômeros com peso molecular de 119 kDa e que podem formar dímeros ou tetrâmeros em suas estruturas ativas (BECERRA; CERDÁN; GONZÁLEZ SISO, 1998; PEREIRA-RODRÍGUEZ *et al.*, 2010). Com base em sua sequência genética, essas enzimas podem ser classificadas em quatro diferentes grupos na família das Glicosil-Hidrolases: GH1, GH2, GH35 e GH42; sendo as  $\beta$ -galactosidases de *K. lactis* pertencentes ao grupo GH2 (SOTO *et al.*, 2017).

$\beta$ -galactosidases podem usar moléculas diferentes da água como nucleófilos, o que pode afetar diretamente a capacidade da enzima em transferir de forma correta a molécula de galactose durante a reação de transgalactosilação. Tal capacidade é influenciada pela concentração do agente doador (para formação do complexo enzima-galactosil, por exemplo, a lactose), pela concentração do aceptor desse complexo (exemplo, a frutose) e a estrutura de aminoácidos da enzima, bem como os aminoácidos residuais que formam o seu sítio ativo, os quais de fato determinam a facilidade que a enzima terá de aceitar nucleófilos diferentes da água e sua capacidade de transferir apropriadamente o complexo galactosil para o carbono C<sub>4</sub> da frutose (posição para formação de lactulose) (SCHUSTER-WOLFF-BÜHRING; FISCHER; HINRICHS, 2010). Destas três características, a mais relevante é a última e difere significativamente, dependendo da cepa de origem da  $\beta$ -galactosidase (GUERRERO; WILSON, 2016; SCHUSTER-WOLFF-BÜHRING; FISCHER; HINRICHS, 2010).

O processo de produção de lactulose por via enzimática foi primeiramente estudado utilizando enzimas livres. Desde a primeira forma de obtenção de lactulose utilizando-se  $\beta$ -galactosidases, por Vaheri e Kaupinnen (1978), até um estudo mais detalhado e abrangente desse processo, houve um intervalo de 25 anos. A partir daí diversos estudos passaram a ser realizados visando entender melhor e identificar os parâmetros de influência nesse processo. Lee e colaboradores (2004) realizaram a avaliação da produção de lactulose, utilizando  $\beta$ -

galactosidase de *Kluyveromyces lactis* ATCC 8585. Para tal, utilizaram o microrganismo de forma indireta no processo de produção, realizando um tratamento de permeabilização celular usando uma solução de etanol (50 % v/v) com 10,4 g/L de células. A concentração de substratos ideal foi 40% de galactose (m/v) e 20% de frutose (m/v), temperatura de 60 °C e pH 7,0. Nessas condições, as células permeáveis produziram uma concentração de lactulose de aproximadamente 20 g/L em 3 horas de reação, obtendo uma produtividade de 6,8 g/L.h (LEE; KIM; OH, 2004).

Mayer e colaboradores (2004) realizaram um estudo semelhante, porém utilizando  $\beta$ -galactosidase de *Aspergillus oryzae* e obtiveram um rendimento 5 vezes maior do que o obtido por Lee e colaboradores (2004). Fattahi e colaboradores (2010) foram os primeiros a utilizarem  $\beta$ -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* na forma livre, sem o uso de células permeáveis, para produção de lactulose. Esses pesquisadores, conseguiram rendimentos aproximados dos obtidos por Lee e colaboradores (2004) e inferiores aos obtidos por Mayer e colaboradores (2004), demonstrando que existia uma forte influência da origem da enzima na produção de lactulose (FATTAHI *et al.*, 2010; LEE; KIM; OH, 2004; MAYER *et al.*, 2004).

Diversas variáveis podem influenciar diretamente nesse tipo de processo. Os principais parâmetros avaliados na otimização da produção enzimática de lactulose e têm influência direta na velocidade de reação, influenciando a produtividade de lactulose são: temperatura, pH, razão enzima/substrato, concentração inicial de açúcares (LEE; KIM; OH, 2004; MAYER *et al.*, 2004). No entanto, o rendimento de lactulose (a quantidade de lactulose produzida por quantidade de substrato fornecido) sofre uma forte influência da razão frutose:lactose, sendo que o rendimento pode aumentar em até três vezes quando eleva-se essa razão de 1 até 8 (GUERRERO *et al.*, 2011). Alterando-se o rendimento de produção de lactulose através da manipulação da razão frutose:lactose (ou seja, alterando-se as concentrações dos substratos presentes na reação), altera-se também a quantidade de lactulose e transgalactooligossacarídeos. Assim, o produto final pode ter um maior teor de lactulose aliado a um baixo teor de outros oligossacarídeos, os quais otimizam as características prebióticas do produto final, podendo até mesmo descartar uma etapa final de purificação da lactulose (GUERRERO; VERA; ACEVEDO; *et al.*, 2015; GUERRERO; WILSON, 2016; HUERTA *et al.*, 2011).

Para se alcançar uma maior produção de lactulose utilizando lactose e frutose como substratos, é necessário fornecer frutose em excesso, favorecendo a reação de transgalactosilação específica que utilize a frutose como acceptor do complexo enzima-

galactosil. Nesse caso em particular, espera-se ter um desfavorecimento da reação de hidrólise e da formação de galactooligossacarídeos, já que a própria lactose também pode atuar como acceptor do complexo enzima-galactosil. Contudo, altas concentrações de frutose residual, bem como concentrações consideráveis de lactose, galactooligossacarídeos e alguns transgalactooligossacarídeos residuais, podem interferir diretamente na qualidade do produto final, necessitando de processos de purificação mais robustos (GUERRERO; VERA; ILLANES, 2017b; GUERRERO; WILSON, 2016).

De Albuquerque e colaboradores (2018) realizaram um estudo de produção enzimática de lactulose por  $\beta$ -galactosidase de *Kluyveromyces lactis*. O objetivo do trabalho foi avaliar o processo de imobilização da enzima em alguns suportes, e a aplicação do biocatalisador obtido na síntese, usando o soro de leite como substrato. No entanto, antes de partir para os estudos com a enzima imobilizada, foi realizada uma investigação prévia do processo utilizando a enzima livre, avaliando os parâmetros como temperatura, pH, concentração inicial de açúcares totais e a razão entre frutose:lactose. Os autores obtiveram uma produção máxima de lactulose de  $15,32 \pm 1,46$  g/L, uma produtividade de 11,3 g/L.h e um rendimento de lactulose de 23,6 %, nas condições de 50 °C, pH 7,0, concentração total de açúcares de 200 g/L e razão de lactose:frutose de 30:15 % (DE ALBUQUERQUE *et al.*, 2018).

Fattahi e colaboradores (2010) avaliaram as reações de hidrólise e transgalactosilação usando lactose na síntese de lactulose, com uma  $\beta$ -galactosidase comercial de *Kluyveromyces lactis*. A concentração máxima de lactulose (1,22 % m/v) foi obtida com o uso de 400  $\mu$ L de solução enzimática ( $\sim 3000$  U/ $\mu$ L) em 100 g de meio, contendo 10 % (m/m) de lactose e 30 % (m/m) de frutose, a 40 °C e pH 6,7, por um período de 120 minutos de reação. Kim e colaboradores (2006) avaliaram também a síntese de lactulose, utilizando uma enzima recombinada de  $\beta$ -galactosidase de *Sulfolobus solfataricus* expressa em *Escherichia coli*. As melhores condições operacionais obtidas foram pH de 6,0 e 80 °C, com uma concentração de substratos de 40 % (m/v) de lactose e 20 % (m/v) de frutose e usando uma carga enzimática de 3,0 U/mL de meio reacional. A concentração máxima de lactulose foi de 50 g/L, em 6h de reação, com uma produtividade de 8,3 g/L.h (KIM, Yeong Su; PARK; OH, 2006).

Hua e colaboradores (2013) avaliaram a produção de 1-lactulose e lactulose usando uma  $\beta$ -galactosidase comercial (DSM *Maxilat*® 5000) de *Kluyveromyces lactis* na presença de frutose. Os experimentos foram realizados a 40 °C e pH 7,5, com uma concentração inicial de lactose de 250 g/L, avaliando-se a concentração de frutose, o tempo de reação e a carga enzimática. Foi observado que em todas as reações a razão 1-lactulose:lactulose foi próxima a

3:1 e esse fato foi associado a regioselectividade da  $\beta$ -galactosidase, ou seja, a uma possível preferência que a enzima possui em ligar o complexo  $\beta$ -galactosil a regiões da molécula de frutose que favoreçam a formação da molécula de 1-lactulose. A produção máxima obtida foi de 22 g/L (para 1-lactulose) e de 8 g/L (para lactulose), com uma concentração de frutose de 100 g/L (HUA *et al.*, 2013).

A produção de lactulose por via enzimática ainda apresenta baixos rendimentos quando comparada à produção por rota química (GUERRERO; WILSON, 2016). A alternativa mais lógica e direta para síntese de lactulose por via enzimática seria a isomerização direta da molécula de lactose, ou seja, através do uso direto de alguma isomerase específica. A rota mais óbvia seria o uso da glicose-isomerase no processo, sendo que tal enzima atuaria na isomerização direta da porção de glicose, presente na molécula de lactose, em frutose e, assim, formar-se-ia a molécula de lactulose. Todavia, tal reação não é possível devido à presença da ligação *o*-glicosídica entre a glicose e a galactose, fazendo com que a etapa de hidrólise seja realmente necessária para produção de lactulose, pois a  $\beta$ -galactosidase que possui a capacidade de quebrar esse tipo de ligação (PANESAR, Parmjit S.; KUMARI, 2011; QUAX, 1993; SONG *et al.*, 2013b). A formação direta de lactulose por isomerização da porção de glicose só é vista através de rotas químicas, utilizando catalisadores alcalinos, como mencionado em tópicos anteriores.

Não obstante, alguns estudos mostram o uso de outra isomerase: a celobiose 2-epimerase na isomerização direta da lactose em lactulose. Na verdade, o que se observa no final do processo é uma mistura composta por lactulose e epilactose, o qual também é um composto com propriedades prebióticas (GUERRERO; WILSON, 2016). Kim e Oh (2012) avaliaram esse processo utilizando celobiose 2-epimerase termoestável, obtida de *Caldicellulosriptom saccharolyticus* e usando apenas lactose com substrato. As melhores condições operacionais por eles determinadas foram pH de 7,5, temperatura de 80 °C, 700 g/L de lactose e uma carga enzimática de 150 U/mL. Sob essas condições, as concentrações de lactulose e epilactose foram 408 g/L e 107 g/L, respectivamente, após um período de 2 horas de reação. Os rendimentos de lactulose e epilactose foram 0,58 g<sub>lactulose</sub>/g<sub>lactose</sub> e 0,15 g<sub>lactulose</sub>/g<sub>lactose</sub>, com uma produtividade de 204 g/L.h e 54 g/L.h, respectivamente (KIM, Jung Eun *et al.*, 2012). De forma semelhante, Kim e colaboradores (2013) também avaliaram o uso da celobiose 2-epimerase obtida de *Dictyoglomus turgidum* no processo de isomerização da porção de glicose presente na lactose, para formação de lactulose. Observou-se, no equilíbrio, um rendimento de 54,3 % (m/m) de

lactulose e 12,8 % (m/m) de epilactose, obtida a partir da reação de epimerização da porção de glicose, presente na lactose, em manose (KIM, Yeong Su; KIM; OH, 2013).

Na grande maioria dos trabalhos que envolvem produção ou uso de  $\beta$ -galactosidases, independente do microrganismo de origem da enzima, é atestado que cátions  $\text{Ca}^{2+}$  inibem o funcionamento da enzima, enquanto que  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Na}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  e  $\text{K}^{+}$  aumentam sua atividade.

$\beta$ -galactosidases de *Kluyveromyces lactis*, por exemplo, necessitam de cátions, como  $\text{Mg}^{2+}$  e  $\text{Mn}^{2+}$ , para manutenção da sua estrutura e estabilidade, otimizando sua atividade catalítica. Albuquerque e colaboradores (2018) avaliaram a influência da presença de cátions metálicos ( $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Zn}^{2+}$ ) no processo de produção de lactulose utilizando  $\beta$ -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* imobilizada em quitosana ativada com glutaraldeído. A concentração de lactulose obtida sem a adição dos íons metálicos foi de 17 g/L. Já com a adição desses íons, observou-se um aumento no rendimento de produção: a adição de  $\text{Mn}^{2+}$  resultou num aumento da conversão máxima de lactose para 88,4 %, enquanto a adição de  $\text{Ca}^{2+}$  ocasionou uma redução nesse mesmo parâmetro, chegando a um valor de conversão máxima de 70,1 %. Valores semelhantes de conversão de lactose foram obtidos com a adição de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Zn}^{2+}$ , sendo 85 e 84 %, respectivamente. A maior quantidade de lactulose produzida foi obtida utilizando uma concentração de 0,01 % (m/v) de  $\text{Mn}^{2+}$ , após 6 h de reação, alcançando uma concentração final de lactulose 21,59 g/L. Os autores confirmaram ainda a hipótese de que a suplementação de cátions  $\text{Ca}^{2+}$  não tem influência sob a produção de lactulose e que a presença desse íon pode ter influência inibitória sob a atividade enzimática, já que não houve diferença dos valores obtidos com e sem suplementação, sendo esses de 18,83 g/L, após 6 horas de reação. De forma semelhante ao relatado na literatura, a adição de íons  $\text{Mn}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  proporcionou um aumento na atividade catalítica da enzima, sendo essenciais para evitar a desativação enzimática em certas condições reacionais (GARMAN; COOLBEAR; SMART, 1996).

É interessante conhecer o mecanismo de interação dos íons metálicos com a enzima, avaliando como cada íon atua de forma específica e sua forma de acoplar à enzima, alterando sua atividade catalítica. Todavia, tal mecanismo ainda não foi totalmente elucidado, sendo necessários estudos mais profundos para seu completo entendimento. Conhecer essas interações abre um leque de alternativas para se utilizar íons específicos para determinadas enzimas e, assim, otimizar-se uma série de bioprocessos. No caso dos íons de  $\text{Mn}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ , o sabe-se que tais cátions não interagem diretamente com o substrato, mas sim com regiões circunvizinhas do

sítios ativo enzimático, agindo como um neutralizador de cargas negativas provenientes de grupos fosfatos presentes no substrato (DE ALBUQUERQUE *et al.*, 2018; LO *et al.*, 2010).

É comum existir em enzimas multiméricas a existência de ligações iônicas por um cátion ou ânion multivalente entre suas subunidades, corroborando ainda mais para a hipótese de que a presença de íons no meio reacional é um ponto chave para manter enzimas multiméricas devidamente estruturadas (FERNANDEZ-LAFUENTE, 2009).

Kim e colaboradores (2006) avaliaram o efeito da presença de cátions divalentes ( $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Co}^{2+}$ ) na atividade da  $\beta$ -galactosidase de *Sulfolobus solfataricus*. Cada cátion foi adicionado até uma concentração final de 1 mM no meio reacional. Observou-se que a adição de  $\text{Fe}^{2+}$  contribuiu em um aumento de 10% na produção de lactulose, enquanto que a adição dos cátions  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Co}^{2+}$  não ocasionou mudanças nos níveis de produção de lactulose, em comparação com o meio reacional sem a presença desses cátions. Contudo, a presença de  $\text{Ba}^{2+}$  reduziu em 73% a produção de lactulose quando comparada ao meio sem a presença desse íon (KIM; PARK; OH, 2006). Esses resultados mostram a importância de se conhecer a origem da  $\beta$ -galactosidase a ser utilizada, pois, para enzimas de diferentes fontes, determinados íons podem contribuir ou não contribuir para o aprimoramento da atividade enzimática. No caso de  $\beta$ -galactosidas obtidas de *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces fragilis* e *Escherichia coli*, a presença dos cátions  $\text{Mn}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  é uma característica em comum entre essas enzimas, pois esses íons atuam de forma tão eficaz na estabilização de suas estruturas quaternárias, que a concentração de proteínas torna-se um parâmetro inerte na estabilização da enzima (FERNANDEZ-LAFUENTE, 2009).

Apesar da produção de lactulose por rota enzimática ser assunto de diversos estudos (DE FREITAS *et al.*, 2020; GUERRERO; ILLANES, 2016; SCHMIDT *et al.*, 2020; SHEN *et al.*, 2012; SITANGGANG; DREWS; KRAUME, 2014a; TABATABAIE, F; MORTAZAVI, 2008), os rendimentos apresentados nas produções desse oligossacarídeo ainda são baixos. Isso faz com que seja necessário a busca por ferramentas para otimização do processo. O tópico a seguir apresenta um breve levantamento de informações acerca de processos de imobilização enzimática e como esses auxiliam e melhoram o rendimento de processos que envolvam biocatalisadores.

### ***3.8.1 Otimização das propriedades enzimáticas através de processos de imobilização e sua aplicação na síntese de lactulose***

A  $\beta$ -galactosidase possui diversas aplicações tanto na indústria alimentícia quanto na indústria de laticínios, mas possui uma estabilidade moderada devido ao fato de ser uma enzima multimérica que pode ter suas subunidades facilmente dissociadas (FERNANDEZ-LAFUENTE, 2009). Técnicas de imobilização através de ligações cruzadas e ligações covalentes multipontuais podem aumentar a estabilidade da enzima, fazendo com que todo seu potencial como biocatalisador possa ser explorado (DE FREITAS *et al.*, 2020; NGUYEN *et al.*, 2018; SCHMIDT *et al.*, 2020; VERA; GUERRERO; ILLANES, 2011). A Tabela 4 apresenta alguns dos mais recentes trabalhos que avaliaram a produção de lactulose usando enzima imobilizada.

Tabela 4 – Fontes e formas de imobilização de  $\beta$ -galactosidases mais recentes avaliadas na síntese de lactulose.

Fonte	Suporte	Referência
<i>Bacillus circulans</i>	Ligações cruzadas entre agregados (CLAG)	(GUERRERO <i>et al.</i> , 2020)
<i>Aspergillus oryzae</i>	Agarose ativada com glioxil	(GUERRERO <i>et al.</i> , 2019)
<i>Aspergillus aculeatus</i>	Quitosana revistada com nano partículas magnéticas	(NGUYEN <i>et al.</i> , 2019)
<i>A. aculeatus</i>	Quitosana ativada com glutaraldeído	(NGUYEN <i>et al.</i> , 2018)
<i>Kluyveromyces lactis</i>	Quitosana ativada com glutaraldeído	(DE ALBUQUERQUE <i>et al.</i> , 2018)
<i>A. oryzae</i>	Esferas de pectinato de cálcio revestidas com quitosana ativada com glutaraldeído	(WAHBA, 2017)
<i>A. oryzae</i>	Agarose ativada com glioxil	(GUERRERO; VERA; ILLANES, 2017b)
<i>A. oryzae</i>	Amino-agarose ativada com glioxil	
<i>A. oryzae</i>	Quelato-agarose ativada com glioxil	
<i>A. oryzae</i>	Quitosana ligada com genipina	(KLEIN <i>et al.</i> , 2016)

Fonte: O Autor (2020).

Assim como outras enzimas,  $\beta$ -galactosidases podem ser imobilizadas de diversas formas, como adsorção física (BETANCOR *et al.*, 2006; KLEIN *et al.*, 2016), encapsulamento (HAIDER; HUSAIN, 2007; NAWAWI *et al.*, 2020) e ligações covalentes (FERNANDEZ-LAFUENTE, 2009; NEIFAR *et al.*, 2020), em diferentes tipos de suportes. Nos tópicos a seguir, uma breve descrição sobre cada um desses protocolos de imobilização.

### 3.8.1.1 Imobilização de $\beta$ -galactosidases por adsorção

O método de adsorção física pode ser considerado o mais simples e de fácil aplicação dentre as técnicas de imobilização citadas anteriormente. A principal forma de interação entre a enzima e o suporte (o qual deve ser insolúvel em água) é através de forças físicas do tipo *van der Waals*. Contudo, outros tipos de interações, como ligações de hidrogênio, ligações iônicas e interações hidrofóbicas podem ocorrer também no processo de imobilização por adsorção física (PANESAR, Parmjit S.; KUMARI; PANESAR, 2010; TORRES-SALAS *et al.*, 2011). Pode-se citar como principal vantagem desse método a sua fácil aplicação e baixa influência sobre a conformação do biocatalisador final, ou seja, praticamente não ocorrem mudanças conformacionais que possam dificultar o acesso ao sítio ativo da enzima pelo substrato. Sua principal desvantagem está associada ao fato das interações entre o suporte e a enzima serem fracas, o que contribui para uma fácil liberação da enzima do suporte. É comum o uso de suportes inorgânicos, tais como cerâmicas, sílica, alumina, vidro poroso, barro, bentonita, etc.; bem como também o uso de suportes orgânicos, como carvão ativado, amido, celulose e algumas resinas de troca iônica (Sephadex, Dowex e Amberlite).

Husain e colaboradores (2011) avaliaram a imobilização de  $\beta$ -galactosidase de *Aspergillus oryzae* em óxido de zinco nativo (ZnO) e em nano partículas de óxido de zinco (ZnO-NP), através do mecanismo de adsorção simples, e aplicaram os biocatalisadores obtidos na hidrólise da lactose do leite e do soro de leite. As formações das ligações foram confirmadas através de microscopia de força atômica e FTIR. Os rendimentos de imobilização foram de 60% e 85%, para o ZnO e para o ZnO-NP, respectivamente. Após 17 ciclos, a atividade retida foi de 61 e 75%, para os suportes ZnO e ZnO-NP, respectivamente. O percentual de lactose hidrolisada no leite foi de 63% para a  $\beta$ -galactosidase em ZnO, e de 71% para o biocatalisador em ZnO-NP, ambos após o tempo de nove horas de reação. Para o soro de leite, os percentuais de hidrólise foram de 68 e 81%, respectivamente (HUSAIN *et al.*, 2011).

Haider e Husain (2009) realizaram um estudo de imobilização de  $\beta$ -galactosidase de *Aspergillus oryzae* por adsorção por bioafinidade, em um suporte de esferas de alginato-amido de cálcio revestidas com Concanavalina A (Con A). A imobilização consistiu em preparar as esferas de alginato-amido de cálcio e revesti-las com a Con A, para em seguida imobilizar a  $\beta$ -galactosidase, através de interações específicas entre as enzimas. Os resultados mostraram um biocatalisador mais estável e resistente a alterações na temperatura (houve um aumento de 10 °C na temperatura ótima de reação, quando comparada com a enzima livre), além de uma maior estabilidade quando na presença de ureia, MgCl<sub>2</sub> e CaCl<sub>2</sub>. A atividade retida foi de 61%, 50% e 43%, na presença de 5% de CaCl<sub>2</sub>, 5% de galactose e 4M de ureia, respectivamente, quando incubadas por 1 hora, a 37 °C. O biocatalisador obtido mostrou um percentual de hidrólise maior do que a enzima livre, tanto na hidrólise da lactose do leite (79 % em 4 h de reação), quanto na hidrólise da lactose do soro de leite (89 % em 3 horas de reação). Outro ponto positivo para o biocatalisador obtido foi em relação a sua estocagem. Após 2 meses de estocagem a 4 °C, o biocatalisador ainda possuía 61 % da atividade inicial, enquanto que a enzima livre apresentou, nessas mesmas condições, apenas 37 % da atividade inicial (HAIDER; HUSAIN, 2009).

Pessela e colaboradores (2003) investigaram a imobilização de  $\beta$ -galactosidase de *Thermus sp.* T2 por adsorção iônica em dois diferentes suportes: o primeiro, uma resina de troca aniônica (Sepabeads®) revestida com polietilenamina (PEI) e o segundo, DEAE-agarose, uma outra resina de troca aniônica convencional. Em ambos suportes, observou-se que a imobilização ocorreu de forma muito rápida. Contudo, a adsorção foi mais forte no caso do suporte revestido com PEI. Em relação a avaliação do processo de hidrólise da lactose, observou-se que o biocatalisador revestido com PEI pôde ser utilizado durante 50 horas em pH 7,0 e 50 °C, na hidrólise de uma solução de lactose de 5 % (m/v), sem nenhum decréscimo da performance da reação (PESSELA *et al.*, 2003).

### 3.8.1.2 Imobilização de $\beta$ -galactosidases por aprisionamento

O método de aprisionamento consiste no confinamento físico da enzima em um pequeno espaço, seja na matriz estrutural de algum suporte, ou até mesmo por aprisionamento em membranas (BORNSCHEUER, 2003; LIESE; HILTERHAUS, 2013). De forma semelhante a adsorção, esse método possui como principal vantagem o fato de ser uma técnica de simples execução, já que as partículas utilizadas no aprisionamento da enzima são obtidas

pelo gotejamento de uma solução polimérica em um meio contendo íons carregados positivamente, ou por algum processo de polimerização térmica, além da formação de partículas mecânica estáveis (PANESAR, Parmjit S.; KUMARI; PANESAR, 2010). A principal desvantagem dessa técnica é a possibilidade de ocorrer “fugas” de moléculas menores que os poros das esferas, durante o uso contínuo (ADLERCREUTZ, 2013). Em geral, matrizes poliméricas, tais como alginato de cálcio, poliacrilamida, colágeno, ágar e *k*-carragenina, são utilizadas como suportes no encapsulamento. Todavia, materiais sólidos, como cerâmicas porosas e carvão ativado, também podem ser usados como suportes. No caso do aprisionamento com membranas, é comum utilizar-se celulose, nylon, polissulfona e poliacrilamida como suportes para esse tipo de imobilização (NAWAWI *et al.*, 2020).

Tizchang e colaboradores (2020) realizaram um procedimento de imobilização de  $\beta$ -galactosidase de *Bifidobacterium bifidum* em duas etapas: na primeira, a imobilização foi realizada por meio de ligações covalentes, utilizando óxido de silício ativado com glutaraldeído como suporte para imobilização direta da enzima; a segunda etapa, consistiu no aprisionamento do biocatalisador obtido na etapa anterior ( $\text{SiO}_2$ - $\beta$ Gal) em uma matriz formada por nano cristais de celulose bacteriológica (NCCB). O rendimento de imobilização obtido na etapa de aprisionamento do biocatalisador foi de 87%, apresentando uma atividade enzimática de 3,4 U. Observou-se uma otimização dos parâmetros físico-químicos, utilizando-se a razão NCCB: $\text{SiO}_2$ - $\beta$ Gal de 1:2, os quais eram pH 6,0 e 40 °C, para a enzima livre; e passaram a ser pH 7,0 e 50 °C, para o biocatalisador aprisionado. A estabilidade operacional do biocatalisador também foi otimizada, obtendo-se um tempo de estocagem de 45 dias, a 4 °C, e uma retenção de 80 % da atividade inicial, após 12 ciclos de reuso (TIZCHANG *et al.*, 2020).  $\beta$ -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* foi imobilizada por aprisionamento em matrizes de sílica gel no estudo realizado por Nichele, Signoretto e Ghedini (2011), no qual o objetivo era o desenvolvimento de um fármaco que pudesse ser utilizado no tratamento de intolerância à lactose. Utilizando o processo sol-gel (nomenclatura adota pelos autores) para imobilização, no qual a estrutura da matriz de aprisionamento cerca a enzima, independentemente de sua conformação, foi obtido um rendimento de imobilização próximo a 100%, além de observar que após 21 dias de estocagem o biocatalisador obtido ainda possuía uma boa estabilidade, com boa textura, boa quantidade de enzima e boa atividade catalítica. Por fim, concluíram que o aprisionamento da enzima promoveu um aumento na temperatura e pH ótimos, quando comparados com a enzima livre (NICHELE; SIGNORETTO; GHEDINI, 2011).

É interessante perceber que o uso de mais de uma técnica de imobilização, a fim de se obter um biocatalisador ainda mais estável, também é possível. Haider e Husain (2007) buscaram o uso dessa estratégia no seu estudo de imobilização de  $\beta$ -galactosidase de *Aspergillus oryzae*. Em um primeiro momento, obteve-se um complexo Concanavalina A- $\beta$ -galactosidase, o qual foi interligado por meio de ligações cruzadas, utilizando glutaraldeído com agente reticulador. Obtido o primeiro derivado, foi realizado um procedimento de aprisionamento em esferas de alginato de cálcio, no intuito de se obter um biocatalisador mais estável e de melhor uso em reatores contínuos. Os resultados mostraram que o biocatalisador aprisionador em esferas de alginato de cálcio reteve um percentual de 81 e 62 % da atividade inicial, após 1 hora em um meio com 5 % de  $\text{CaCl}_2$  e 5 % de galactose, respectivamente. Além disso, essa técnica de combinação de imobilizações se mostrou mais eficaz do que outros procedimentos simples de aprisionamento, em processos contínuos de hidrólise de lactose. A avaliação de sua estabilidade operacional mostrou um percentual de atividade retida de 95% após 17 ciclos de reuso e um tempo de estocagem de 2 meses, a 4 °C, mantendo 93% da atividade inicial oferecida (HAIDER; HUSAIN, 2007).

### 3.8.1.3 Imobilização de $\beta$ -galactosidases por ligações covalentes

Ligações covalentes são formadas a partir da interação de grupos funcionais presentes na enzima e na superfície do suporte. Em geral, os grupos que estão envolvidos nessas ligações são amino, carboxila, carbonila, hidroxila e sulfidríla (MATEO, Cesar *et al.*, 2007). Tais grupos funcionais não devem estar presentes no sítio ativo enzimático, para que não ocorra a formação de impedimentos por parte de ligações covalente indesejadas com o suporte nessa região da enzima. Para tal, em alguns processos de imobilização é comum ter presente no meio um inibidor competitivo ou o substrato da enzima, para que o sítio ativo seja protegido. (PANESAR, S.; KUMARI; PANESAR, 2010).

O método de ligações covalentes pode ser considerado o mais forte em relação aos demais aqui apresentados. As ligações covalentes formadas durante o processo de imobilização são mais estáveis e previnem que a proteína seja liberada do suporte durante o seu uso (DUARTE *et al.*, 2017).

Diversos compostos podem ser usados como suportes para formação de ligações covalentes. Um dos fatores determinantes para a escolha de um bom suporte para esse tipo de imobilização é conhecer bem os grupos residuais presentes na estrutura da enzima e, a partir

daí, escolher um suporte que possua grupos funcionais que interajam de maneira mais eficiente com os grupos presentes na enzima (BORNSCHEUER, 2003). Esse tipo de interação abre um leque para o desenvolvimento de enzimas com propriedades químicas e físicas bastante específicas, tais como a distribuição de cargas na superfície, espaçamento do braço ligante, efeitos de partição, alterações na razão hidrofobicidade:hidrofilicidade, entre outros (DICOSIMO *et al.*, 2013; PANESAR, Parmjit S.; KUMARI; PANESAR, 2010).

No entanto, apesar de ser um método bastante promissor, esse tipo de imobilização pode vir a ser uma técnica relativamente cara e complexa de ser aplicada. Ainda que abra um leque de possibilidades de desenvolver-se biocatalisadores obtidos especificamente para determinada reação ou aplicação, os reagentes químicos utilizados durante a imobilização, em geral, são caros e podem fazer com que ocorra uma redução da atividade enzimática devido a exposição da enzima à meios mais severos (BARBOSA *et al.*, 2015), pois vale lembrar que o processo de imobilização deve ser feito em condições mais suaves e brandas, para que não afete nem possa levar ao desnaturamento da enzima. Além disso, algumas reações químicas utilizadas para facilitar a formação das ligações covalentes podem alterar diretamente o sítio ativo enzimático, e muitos desses reagentes irão necessitar de um cuidado especial para serem descartados após seu uso (PANESAR, S.; KUMARI; PANESAR, 2010). Na verdade, para que um processo de imobilização por ligações covalentes seja efetivo, é necessário escolher um suporte com o maior número de grupos funcionais disponíveis para interação com a enzima, sem que ocorra a necessidade de processos de ativação do suporte. A quantidade de grupos funcionais com os quais a enzima irá se ligar afetará diretamente sua estabilidade (FERNÁNDEZ-LAFUENTE *et al.*, 1999; MATEO, Cesar *et al.*, 2005). Alguns suportes que contenham em sua superfície grupos epóxi são bem suscetíveis a formação de ligações covalentes multipontuais com diferentes nucleófilos (aminos, hidroxilas, tióis) presentes na superfície da enzima (MATEO, Cesar *et al.*, 2007).

A quitosana é um dos suportes orgânicos mais utilizados em imobilizações por ligação covalente (DE FREITAS *et al.*, 2020; KLEIN *et al.*, 2016, 2013; NGUYEN *et al.*, 2018; URRUTIA, Paulina *et al.*, 2018). Ela é obtida da desacetilação da quitina, que é um dos polímeros mais abundantes na natureza. Possui um baixo custo, é renovável e biodegradável, possui uma boa biocompatibilidade, baixa toxicidade, quimicamente inerte e grande hidrofilicidade (LIMA *et al.*, 2013). Possui uma estrutura similar à da celulose, diferindo apenas nos seus grupos funcionais, pois além de possuírem grupos hidroxilas (OH-) ao longo de toda sua cadeia, a quitosana difere por possuir grupamentos amina (NH<sub>2</sub>-) (LIMA *et al.*, 2013;

WAHBA, 2017). A quitosana também pode ser utilizada de diferentes formas, sendo as mais comuns na forma de hidrogéis e membranas, devido essas formas apresentarem aumento no diâmetro do poro da partícula, facilitando o processo de imobilização.

Lima e colaboradores (2013) produziram  $\beta$ -galactosidase a partir de uma cepa de *Kluyveromyces lactis* NRRL Y1564 e avaliaram sua imobilização em quitosana ativada com glutaraldeído. A ativação do suporte de quitosana com glutaraldeído confere àquele uma maior quantidade de grupos funcionais disponíveis na superfície do suporte, promovendo uma maior quantidade de pontos para ligações covalentes entre os grupos residuais da enzima e os grupos funcionais do glutaraldeído. Nesse caso, por se tratar de uma molécula bifuncional, com dois grupos aldeídos em cada extremidade, o glutaraldeído reage com os grupos amino presentes na superfície da quitosana, formando um braço extensor para potencializar a “captura” da enzima. As amins residuais da enzima interagirão com os aldeídos livres do glutaraldeído. As hidroxilas residuais e que não reagem com os aldeídos do glutaraldeído, estarão disponíveis para interagir com outras amins residuais presentes na estrutura enzimática, porém, formando ligações mais fracas e facilmente quebradas (KLEIN *et al.*, 2013; URRUTIA, Paulina *et al.*, 2018). Dessa forma, observou-se que a imobilização da enzima proporcionou um aumento no nível de pH suportado, em comparação à enzima livre (de 6,5 para 7,0). A temperatura ótima para reação da enzima imobilizada foi de 50 °C. Nessa faixa de temperatura, o biocatalisador foi oito vezes mais estável do que a enzima solúvel, e suportou 10 ciclos, mostrando uma retenção de atividade de 70 % da inicial. Em relação a estocagem, o biocatalisador obtido foi estocado por 93 dias, a 4 °C e em pH 7,0, sem ter sua atividade afetada, mantendo 100 % de seu valor original (LIMA *et al.*, 2013).

De forma semelhante, Albuquerque e colaboradores (2018) avaliaram a imobilização de  $\beta$ -galactosidase comercial de *Kluyveromyces lactis* em quitosana ativada com glutaraldeído, para utilizar o biocatalisador no processo de hidrólise da lactose do soro de leite e produção de lactulose. Em um primeiro momento, foram obtidas as melhores condições operacionais de produção de lactulose utilizando a enzima livre. Em seguida, imobilizou-se a enzima, seguindo um protocolo semelhante ao adotado por Lima e colaboradores (2013), a fim de se obter um biocatalisador mais estável e ativo para produção de lactulose utilizando o soro de leite como substrato. A produção máxima de lactulose obtida foi de 17,3 g/L, nas condições operacionais de pH 7,0, temperatura de 50 °C, concentração total de açúcares de 200 g/L (razão lactose:frutose de 15:30 %) e adição de 0,01 % (m/m) de  $Mg^{2+}$  (DE ALBUQUERQUE *et al.*, 2018).

Outro suporte comumente utilizado em processos de imobilização covalente é a agarose, que é um polímero polissacarídico natural, extraído de algas vermelhas marinhas, que possuem em sua composição agarobiose, um dissacarídeo composto por D-galactose e 3,6-anidro-L-galactopiranosose). Agarose é o principal constituinte do ágar, podendo ser preparada como um gel termorreversível. Diferente da quitosana, a agarose possui apenas um grupo funcional hidroxila em sua estrutura, fazendo com que uma etapa de ativação desse suporte seja importante para uma imobilização eficiente. Suárez e colaboradores (2018) avaliaram o efeito do tamanho da partícula de agarose e a carga enzimática para esse suporte nas reações simultâneas de hidrólise e transgalactosilação para produção de galactooligossacarídeos por  $\beta$ -galactosidase de *Aspergillus oryzae*. Para o processo de imobilização foi necessária uma etapa de ativação do suporte com glioxil, que permite a formação de grupos aldeídos responsáveis pela formação de bases de *Shiff* com os grupos amino da enzima, formando diversos pontos de ligações de covalente disponíveis (HUERTA *et al.*, 2011; MATEO, Cesar *et al.*, 2005; MATEO, César *et al.*, 2006). Assim, de posse dos biocatalisadores, eles observaram que a razão das taxas de reação de hidrólise e reação total ( $r_{hid}/r_{total}$ ) foi de 16 e 30 %, para o biocatalisador com menor tamanho e menor carga enzimática e para o biocatalisador com maior tamanho e maior carga enzimática, respectivamente. De forma semelhante, avaliaram a taxa de reação de transgalactosilação e reação total ( $r_{trans}/r_{total}$ ), a qual foi de 84 e 70 %, para o biocatalisador com menor tamanho e menor carga enzimática e maior tamanho e maior carga enzimática, respectivamente (SUÁREZ *et al.*, 2018).

Existe uma outra alternativa de imobilização por ligação covalente, que consiste em distribuir diferentes grupos funcionais ao longo da superfície do suporte e assim promover a ligação da enzima por diferentes zonas da superfície do suporte. A imobilização heterofuncional é uma boa alternativa para otimizar a imobilização em agarose ativada com glioxil (glicidol), promovendo novas zonas de imobilização e fazendo com que a imobilização não dependa apenas de regiões com alta densidade de resíduos de lisina na enzima, os quais têm maior facilidade de interagir com grupamentos presentes na superfície do suporte, como hidroxilas, por exemplo (MATEO, Cesar *et al.*, 2007). A estratégia utilizada nesse caso é utilizar suportes com mais de um grupo funcional disponível para ligação. Um estudo desse tipo foi realizado por Guerrero e colaboradores (2017), os quais avaliaram a imobilização de  $\beta$ -galactosidase de *Aspergillus oryzae* em quatro diferentes suportes, sendo um suporte monofuncional, composto apenas por agarose ativada com glioxil sem alterações, e três tipos de suportes heterofuncionais, os quais utilizaram epóxi-agarose como suporte base e foram ativados em um primeiro

momento com agarose: amino-glioxil-agarose (Am-GA) (ativação feita com trietilamina), carboxil-glioxil-agarose (Cx-GA) (ativação feita com ácido iminodiacético) e quelato-glioxil-agarose (Che-GA) (ativação feita com solução de  $\text{CuSO}_4$ ). As atividades específicas obtidas para Am-GA, Cx-GA e Che-GA foram 3676, 430 e 454 U/g de biocatalisador, com tempos de meia-vida a 50 °C de 247, 100 e 100 horas, respectivamente. O maior rendimento de imobilização foi de 39,4% para o suporte Am-GA, e o maior rendimento de produção de lactulose foi obtido com o suporte monofuncional de glioxil-agarose (GUERRERO *et al.*, 2017).

$\beta$ -galactosidases imobilizadas podem ser usadas de várias formas em processos de hidrólise de lactose do leite e do soro de leite, bem como na produção de oligossacarídeos (DE FREITAS *et al.*, 2020). A escolha da forma de imobilização depende basicamente da natureza do substrato, das características da enzima e do suporte e da parte econômica do processo em si (PANESAR, S.; KUMARI; PANESAR, 2010). São diferentes formas e protocolos de imobilização e com o decorrer dos anos sempre surgem novas técnicas ou novas formas de otimização das técnicas já utilizadas. A Tabela 5 apresenta um levantamento com estudos de imobilização de  $\beta$ -galactosidases e os tipos de imobilização utilizados ao longo dos últimos anos.

Tabela 5 – Fontes de  $\beta$ -galactosidases e diferentes métodos e suportes usados para imobilização (continua).

<b>Método de imobilização</b>	<b>Fonte da <math>\beta</math>-galactosidase</b>	<b>Suportes</b>	<b>Referência</b>
Adsorção	<i>Aspergillus oryzae</i>	Nano partículas de ZnO	(HUSAIN <i>et al.</i> , 2011)
	<i>A. oryzae</i>	Amido-alginato de cálcio revestido com Concanavilina A	(ANSARI; HUSAIN, 2011)
	<i>Thermus sp.</i> T2	PEI-Sepabeads, DEAE-Agarose	(PESELA <i>et al.</i> , 2003)
	<i>A. oryzae</i> , <i>Bacillus circulans</i> e <i>Kluyveromyces lactis</i>	Sílica	(BERNAL; SIERRA; MESA, 2014)
	<i>A. oryzae</i>	Nanocompósito de nanotubos de carbono com múltiplas camadas de polianilina cobalto	(KHAN; HUSAIN; BUSHRA, 2017)
	<i>K. lactis</i>	Membrana de mistura de matrizes de ZrO <sub>2</sub>	(JOCHEMS <i>et al.</i> , 2011)
	<i>K. lactis</i>	Hidrogéis enxertados com quitosana	(FACIN <i>et al.</i> , 2015)
	<i>Kluyveromyces fragilis</i>	Esferas de celulose	(ROY; GUPTA, 2003)
	<i>Aspergillus niger</i>	Monólito de cerâmica	(PAPAYANNAKOS; MARKAS; KEKOS, 1993)
	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Sílica e Alumina	(DI SERIO <i>et al.</i> , 2003)
Aprisionamento	<i>K. lactis</i>	Silano modificado	(BIRO <i>et al.</i> , 2016)
	<i>A. oryze</i>	Quitosana-cinamato	(MONIER; YOUSSEF; ABDEL-LATIF, 2018)

Tabela 5 – Fontes de  $\beta$ -galactosidases e diferentes métodos e suportes usados para imobilização.

<b>Método de imobilização</b>	<b>Fonte da <math>\beta</math>-galactosidase</b>	<b>Suportes</b>	<b>Referência</b>
Aprisionamento	<i>K. lactis</i>	Alcoxissilanos e Alquilsilanos	(BIRÓ <i>et al.</i> , 2016)
	<i>K. lactis</i>	Matrizes de sílica gel	(NICHELE; SIGNORETTO; GHEDINI, 2011)
	<i>A. oryzae</i>	Alginato de cálcio	(HAIDER; HUSAIN, 2007)
Ligações covalentes	<i>K. lactis</i>	Polissiloxano-Álcool polivinílico	(GONZÁLEZ-CATAÑO <i>et al.</i> , 2017)
	<i>K. lactis</i>	Glioxil-Sepharose®	(BERNAL <i>et al.</i> , 2013)
	<i>K. lactis</i>	Nanopartículas de SiO <sub>2</sub>	(VERMA <i>et al.</i> , 2012)
	<i>K. lactis</i>	Colágeno	(GENNARI; MOBAYED; CATTO; <i>et al.</i> , 2019)
	<i>A. oryzae</i> e <i>K. lactis</i>	Nanocelulose magnética	(GENNARI; MOBAYED; DA ROLT NERVIS; <i>et al.</i> , 2019)
	<i>K. lactis</i>	Quitosana ativada com glutaraldeído	(KLEIN <i>et al.</i> , 2013)
	<i>K. lactis</i>	Superfícies de grafite	(ZHOU; CHEN, 2001)
	<i>K. lactis</i>	Eupergit C®	(DA SILVA CAMPELLO <i>et al.</i> , 2012)
	<i>B. circulans</i>	Suportes de glioxil-agarose	(URRUTIA, P <i>et al.</i> , 2013)
<i>A. oryzae</i>	Quitosana ativada com glutaraldeído e epiclorigrina	(URRUTIA, Paulina <i>et al.</i> , 2018)	

Fonte: O Autor (2020).

Além de todos os parâmetros mencionados e que podem influenciar ou não o processo de produção enzimática de lactulose, é importante destacar que um dos principais pontos que atraem a atenção para esse tipo de bioprocessos é a possibilidade de se utilizar substratos não puros, oriundos de diversas fontes de obtenção, devido à especificidade das enzimas utilizadas nesses processos. O tópico seguinte trará uma breve descrição acerca da obtenção de substratos para produção de compostos de valor agregado.

### **3.9 O uso de resíduos industriais como substratos para produtos de valor agregado**

A geração de resíduos e a problemática ambiental são assuntos comuns nos últimos anos e que têm sido alvo de diversos debates e estudos. A preocupação com o desenvolvimento sustentável tem levado a reflexões acerca da forma adequada que tais resíduos devem ser tratados antes de entrarem em contato com o meio ambiente. Além disso, a necessidade de se desenvolver tecnologias de reaproveitamento de tais resíduos também vem sendo o foco de pesquisas nos últimos anos.

A implementação de políticas sustentáveis, além de visar uma redução no impacto ambiental, com o uso de tecnologias que minimizem os níveis de contaminantes presentes nos efluentes, possibilita a reutilização de alguns desses resíduos (MORTON; PENCHEON; BICKLER, 2019). A problemática do gerenciamento de resíduos ocorre basicamente no tratamento de redes de águas residuais. Dessa forma, o setor alimentício pode ser considerado um dos principais contribuintes na geração desses efluentes, já que seu rápido crescimento está diretamente relacionado com o rápido crescimento econômico e populacional (UÇKUN KIRAN *et al.*, 2014). Nesse contexto, pode-se definir um resíduo do setor alimentício como um rejeito orgânico obtido a partir do processamento industrial, comercial e/ou doméstico de alimentos de qualquer espécie. A geração desses rejeitos abrange desde os níveis agrícolas, passando pelos níveis de processamento industrial até chegar aos níveis de utilização domésticos (MIRABELLA; CASTELLANI; SALA, 2014).

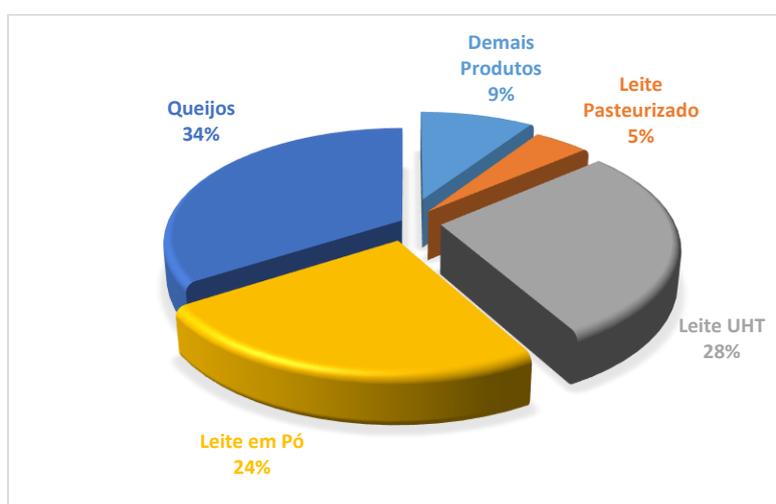
#### **3.9.1 O setor de laticínios**

Uma das principais formas de se observar a geração de resíduos industriais é pela quantidade de efluentes gerados por determinado processo. Nessa perspectiva, o setor lácteo tem uma parcela significativa de contribuição. A produção nacional de leite no ano de

2020 foi de 845,7 milhões, o que representou um aumento de 10,83 % em relação ao consumo de 2019, segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE (IBGE, 2020).

O setor lácteo é subdividido em diversos setores industriais, sendo o setor alimentício o principal beneficiado. A Figura 10 apresenta os principais destinos para utilização do leite produzido no ano de 2019.

Figura 10 – Destinação do leite inspecionado no mercado nacional durante o ano de 2019.



Fonte: Embrapa (2019).

Os efluentes gerados pelo setor de laticínios possuem elevado teor de matéria orgânica, o que contribui de forma significativa para proliferação de microrganismos, sendo tal fato constatado com a alta Demanda Biológica de Oxigênio (DBO) e alta Demanda Química de Oxigênio (DQO). Tais parâmetros, aliados com o alto teor de sólidos suspensos (0,1 a 22 kg/m<sup>3</sup>), presença de nutrientes essenciais e alta taxa de lipídeos (0,1 a 10,6 kg/m<sup>3</sup>) mostram que se faz necessário uma maior atenção no descarte desses efluentes no meio ambiente (OLIVEIRA; BRAVO; TONIAL, 2012; PINHEIRO ALVES *et al.*, 2014). A Tabela 6 apresenta a composição dos efluentes da indústria de laticínios.

Tabela 6 – Composição média e características físico-químicas dos efluentes gerados nos processos industriais da indústria de laticínios.

<b>Constituinte</b>	<b>Efluente</b>
Temperatura (°C)	48
pH	6,6
Porção Sólida (g <sup>-1</sup> )	70 ± 2
Porção Volátil (g <sup>-1</sup> )	65 ± 2
Matéria Seca (g.kg <sup>-1</sup> )	102
Sólidos Suspensos (g <sup>-1</sup> )	3
DQO (g <sup>-1</sup> )	11
DQO/DBO	4,7

Fonte: Azzouni, Eloutassi, Lahkimi, Louaste, & Chaouch (2019).

A indústria de laticínios possui uma gama de produtos gerados a partir do leite (manteiga, iogurtes, sorvetes, doces, etc.) que contribuem de forma significativa para a produção de águas residuais e geram efluentes ricos em diversos compostos. Percebe-se que a grande maioria do leite produzido no ano de 2019 foi destinado à produção de queijos (Figura 10) (aproximadamente 8,31 bilhões de litros de leite) e durante seu processo de produção é que se forma o principal rejeito da indústria láctea: o soro de leite. O descarte inapropriado de efluentes ricos em soro de leite pode causar o aumento dos níveis de acidez com alteração nas características físico-químicas de solos e águas, além de contribuir para proliferação de culturas microbianas indesejáveis (MANTOVANI *et al.*, 2015; PINHEIRO ALVES *et al.*, 2014).

Estima-se que para cada quilograma de queijo produzido, nove litros de soro de leite são gerados (OLIVEIRA; BRAVO; TONIAL, 2012). Este fato reforça a necessidade de alternativas que levem ao reaproveitamento desse subproduto. Seu alto valor nutricional, aliado ao grande volume gerado tornam essa uma promissora matéria-prima para geração de produtos com valor agregado. Em geral, o soro de leite obtido é destinado a suplementação de ração animal e adubo. No entanto, novos estudos mostram que o leque de aplicações do soro de leite pode ir desde de sua aplicação no setor farmacêutico (GIRALDO *et al.*, 2017) até o uso como substrato para produção de enzimas (DE FREITAS *et al.*, 2020; LIMA *et al.*, 2013).

### 3.9.2 O soro de leite

As características do soro de leite dependerão muito da qualidade e da origem do leite utilizado. Fatores como alimentação, raça, estágio de lactação e saúde do animal são determinantes nas características do soro obtido. Os principais leites utilizados são oriundos de bovinos, cabras, ovelhas e búfalos (RAMOS *et al.*, 2015). A presença do soro de leite em corpos d'água pode causar impermeabilização, aumento no consumo de oxigênio, eutrofização, toxicidade entre outros (RAJESHWARI *et al.*, 2000).

O soro de leite (soro lácteo ou soro de leite bovino) é a porção aquosa liberada durante a produção convencional de queijos, após a separação do resultante da coagulação do leite por enzimas. É composto basicamente por água (93% m/m) e contém aproximadamente 50% dos nutrientes presentes no leite. Possui uma coloração verde-amarelado, devido à presença da vitamina B2 (riboflavina) e da precipitação e remoção da caseína durante o processo de produção do queijo (GONZÁLEZ SISO, 1996; RAMOS *et al.*, 2015). É composto majoritariamente por lactose (39-60 Kg/m<sup>3</sup>), a qual constitui aproximadamente 90% da fração mássica do soro. O restante da composição mássica se divide entre gorduras (0,99-10,58 Kg/m<sup>3</sup>) e proteínas (1,4-8,0 Kg/m<sup>3</sup>).

Os altos valores de DBO e DQO (27-60 Kg/m<sup>3</sup> e 50-102 Kg/m<sup>3</sup>, respectivamente) contribuem para que esse rejeito seja tratado através de processos biológicos (PRAZERES; CARVALHO; RIVAS, 2012). Alguns sais inorgânicos estão presentes em sua composição, mas isto devido ao processo de produção dos queijos, no qual utiliza-se NaCl, KCl e alguns sais de cálcio. Alterações em propriedades físico-químicas podem interferir diretamente em processos biológicos de tratamento do soro de leite. Em pH muito ácido, pode ocorrer o crescimento de biomassa filamentosa (GHALY, 1996). Já no caso de uma baixa alcalinidade, é observado uma rápida acidificação do meio (CASTELLÓ *et al.*, 2009). Além disso, fatores como a presença de amônia, ácidos graxos voláteis e potássio também podem ocasionar a inibição de processos biológicos (APPELS *et al.*, 2008; PRAZERES; CARVALHO; RIVAS, 2012).

O descarte apropriado do soro de leite é algo necessário e de extrema importância. No entanto, olhando sob uma perspectiva de valorização desse rejeito, o soro de leite é rico em nutrientes que podem ser usados em diversos processos de obtenção de produtos com valor agregado. Quantidades significativas de ácido láctico, ácido cítrico, ureia, ácido úrico, vitaminas do grupo B, imunoglobulinas,  $\alpha$ -imunoglobulinas,  $\beta$ -

imunoglobulinas, albumina e lactoferrina também podem ser encontradas no soro de leite. Tais compostos aumentam o potencial desse rejeito para o seu uso em processos diversos, devido as características nutricionais e medicinais que os componentes presentes em sua composição apresentam (CASAL *et al.*, 2006; PANESAR., 2007; PRAZERES; CARVALHO; RIVAS, 2012).

Bosso e colaboradores (2019) avaliaram o uso do soro de leite como substrato para a cepa *Saccharomyces fragilis* IZ 275 na produção de  $\beta$ -galactosidase. A cinética de crescimento do microrganismo foi avaliada por meio do consumo de lactose e da produção de biomassa e enzima. Após 12 horas de cultivo, observaram que 11% do substrato ainda estava presente no meio, indicando um consumo médio de lactose de  $2,63 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ . O crescimento celular foi de  $11,06 \text{ mg.mL}^{-1}$  com uma taxa de crescimento específica de  $0,317 \text{ h}^{-1}$  no tempo de 20 horas de cultivo. A atividade da enzima obtida foi de  $14,28 \text{ U.mL}^{-1}$  (BOSSO *et al.*, 2019).

Murari e colaboradores (2019) investigaram a otimização do processo de produção de etanol por *Kluyveromyces marxianus* URM 7404 utilizando o soro de leite com substrato. Foram estudados parâmetros como pH, temperatura e concentração de lactose no processo, utilizando metodologias de superfície de resposta com Design Rotacional de Composto Central (em inglês, *Central Composite Rotational Design – CCRD*). Os modelos gerados a partir dessas metodologias foram validados com dados obtidos de 20 fermentações do soro de leite. Com base nos dados obtidos através dos modelos já validados, os autores realizaram o processo de otimização e *scale-up* do sistema. Numa escala de significância, perceberam que a temperatura foi o parâmetro mais influente, seguido do pH e da concentração de lactose. O uso dos modelos validados permitiu o uso de um reator de 36 L, com um rendimento de 98,8 %, produtividade de  $2,57 \text{ g/L.h}$  e  $Y_{P/S}$  de  $0,5 \text{ g/g}$ . Por fim, a Demanda Química de Oxigênio foi reduzida em 78,94 %, mostrando que além de se otimizar o processo de produção etanol, houve também a redução de possíveis danos ambientais causados por esse efluente (MURARI *et al.*, 2019).

Alguns estudos também relatam o uso de soro de leite combinado com outros compostos para favorecimento ou inibição na produção de alguns compostos. Alonso e colaboradores (2015) avaliaram a combinação de substratos para investigar a versatilidade da cepa *Pseudomonas taetrolens* em processos de co-fermentação, combinando o soro de leite com glicose, glicerol e lactose, para produção de ácido glucônico e ácido lactobiônico. Foi observado que a presença de glicose leva a uma produção simultânea de ácido glucônico

(8,8 g/L) e ácido lactobiônico (78 g/L). Na presença de glicerol, ocorre um aumento na densidade celular (1,8 g/L), acompanhado de uma redução no rendimento da produção de ácido lactobiônico (~82 %). Já na presença de lactose, observou-se um aumento significativo na produção de ácido lactobiônico (rendimento de 100%) juntamente com uma alta produtividade específica deste composto (1,4 g/g.h) (ALONSO; RENDUELES; DÍAZ, 2015).

Como mencionado, o soro de leite pode ser utilizado como substrato para produção de compostos de valor agregado, bem como na produção de enzimas, por meio de rotas fermentativas. Além dessas finalidades, o soro de leite pode ser utilizado em reações enzimáticas, sendo convertido também em produtos de valor agregado e de interesse comercial. Como exemplo dessa aplicação, o estudo de Choi e colaboradores (2020) mostra a geração de energia através do uso de soro de leite em células enzimáticas de combustível, utilizando a celobiose desidrogenase. Para aumentar a performance da célula, foram avaliados a concentração enzimática, o pH da reação e a concentração inicial de lactose. Com o uso do soro de leite foi possível obter uma densidade de potência de  $1.839 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ , nas condições de 47,07 mg/mL de concentração de celubiose-desidrogenase, 100 mM de lactose e pH de 4,5, mostrando que o soro de leite também pode ser utilizado na geração de energia (CHOI *et al.*, 2020).

No entanto, não é apenas por seu alto valor nutricional que o soro de leite vem chamando a atenção para estudos que utilizam esse tipo de substância como substratos de para reações bioquímicas. As proteínas presentes em sua composição apresentam um elevado teor de aminoácidos essenciais, tais como lisinas, aminoácidos sulfúricos, metionina e cisteína, além de aminoácidos ramificados (isoleucina, leucina e valina), que são importantes no metabolismo de diferentes tipos de microrganismos (MCDONOUGH *et al.*, 1974) e também atraem a atenção para o desenvolvimento de rotas de aproveitamento dessas moléculas.

### ***3.9.3 O uso do soro de leite como substrato para produção de oligossacarídeos e a integração de processos como forma de otimização da produção de lactulose***

Como visto anteriormente, o soro de leite possui um alto potencial para ser usado com substrato para bioprocessos voltados para produção de moléculas de valor agregado. O presente estudo aborda essa proposta do uso do soro de leite residual como substrato para a

produção de lactulose, partindo de dados já consolidados e visando desenvolver um protocolo operacional que otimize sua produção.

Mano, Paulino & Pastore (2019) propuseram o uso do soro de leite residual de uma indústria de alimentos no processo de produção de galactooligosacarídeos, comparando o uso de três  $\beta$ -galactosidases de fontes diferentes (*A. oryzae*, *E. coli* e *K. lactis*). A enzima proveniente de *K. lactis* mostrou os melhores resultados para o processo, com um percentual de hidrólise da lactose de 89,27 %, rendimento de produção de galactooligosacarídeos de 25 g de GOS/100 g de lactose oferecida e uma produtividade específica de 51 g de GOS/g de enzima.h. Ao término do estudo, os autores concluíram que a  $\beta$ -galactosidase de *K. lactis* era aceitável para aplicação no desenvolvimento de processo biotecnológicos mais robustos.

Freitas e colaboradores (2020) avaliaram o uso de uma  $\beta$ -galactosidase obtida a partir de uma cepa de *K. lactis* modificada geneticamente (*K. lactis* NRRL Y1564), na hidrólise e produção de lactulose simultâneas, utilizando o soro de leite como substrato. Afim de se otimizar o biocatalisador, os autores realizaram procedimentos de imobilização em quitosana ativadas por três diferentes agentes químicos: glutaraldeído, epícloridrina e glicidol. Os percentuais de hidrólise obtidos foram de 38 e 42,8 %, para a enzima livre e imobilizada, respectivamente. A quantidade máxima de lactulose produzida a partir do uso do soro de leite foi de 17,32 g/L. Esses resultados colaboram para a hipótese do potencial de uso do soro de leite nesses processos biológicos.

Outra forma de se otimizar o uso de soro de leite em processos de produção de oligossacarídeos, dentre eles a lactulose, é combinar o uso de enzimas que auxiliem em uma determinada etapa da reação. Por exemplo, no estudo realizado por Song e colaboradores (2013) os autores propõem o uso da enzima glicose-isomerase de *Streptomyces rubiginosus* para atuar antes da etapa de transgalactosilação, isomerizando a glicose liberada pela hidrólise da lactose, feito por uma  $\beta$ -galactosidase de *K. lactis* utilizando soro de leite. Nos experimentos propostos pelos autores, as duas enzimas foram imobilizadas no mesmo tipo de suporte de sílica-gel, mas não de forma simultânea, sendo cada enzima imobilizada em seu suporte. Os resultados obtidos mostraram uma produção de lactulose de 7,68 g/L e uma produtividade específica de 0,32 mg/U.h. Além desses resultados, os autores avaliaram o reuso das enzimas imobilizadas, constatando que seu percentual catalítico ainda se manteve em 57,1 %, após 7 ciclos seguidos (SONG *et al.*, 2013b).

Alguns estudos que trazem essa temática sobre a integração de processos, têm na sua essência a proposta de se utilizar um outro biocatalisador para auxiliar em determinada etapa da reação, como o mencionado acima, além de apresentar novas propostas de reatores utilizados para os processos de produção. Porém, poucos são os trabalhos que exploram o uso de diferentes conformações operacionais, modificando-se o tipo de reatores utilizados, a fim de se obter uma configuração operacional mais eficaz para produção desses compostos. O presente trabalho sugere essa proposta, analisando cada etapa de forma singular para depois integrar os processos e observar o comportamento da reação. Já existem estudos que abordam o uso de outras configurações reacionais, como o uso de bateladas alimentadas, para produção de oligossacarídeos (GUERRERO; VERA; ILLANES, 2017a). No entanto, o uso de reatores de leito fixo ainda é pouco explorado para produção de oligossacarídeos utilizando soro de leite como substrato. No presente estudo, algumas hipóteses acerca de conformações operacionais serão levantadas e avaliadas, partindo de dados obtidos a partir de estudos prévios, como temperatura de reação, presença de íons metálicos, pH do meio reacional e força iônica do tampão utilizado (DE ALBUQUERQUE *et al.*, 2018) e dos resultados obtidos nos estudos feitos em batelada, acerca da produção desses compostos por  $\beta$ -galactosidases.

O capítulo seguinte trará informações sobre os materiais utilizados e as metodologias empregadas para o desenvolvimento dos estudos que iram contribuir para sustentação do presente estudo.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Material

#### 4.1.1 Reagentes

Os reagentes utilizados, lactose, lactulose, rafinose, estaquiose, glicose, frutose, fosfato de potássio mono e bibásico, hidróxido de potássio, hidróxido de sódio, ácido acético, glutaraldeído 25% (v/v), *o*-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo (ONPG) e quitosana de baixo peso molecular, foram adquiridos da Sigma-Aldrich Chemical Co. (St Louis, MO). O soro de leite em pó e desmineralizado foi gentilmente cedido pela Sorvetes Frosty (Maracanaú, Ceará, Brasil).

#### 4.1.2 Enzimas

As enzimas  $\beta$ -galactosidases (E.C. 3.2.1.23) de *Kluyveromyces lactis*, Lactozyme<sup>®</sup> 2600 e de *Aspergillus oryzae*, a enzima imobilizada Glicose Isomerase (GI) de *Streptomyces murinus* *Novozymes Sweetzyme*<sup>®</sup> ( $\geq 350$  U/g) (E. C. 5.3.1.5), foram obtidas da Sigma-Aldrich-Chemical Co. (St Louis, MO).

### 4.2 Métodos

#### 4.2.1 Determinação da atividade enzimática da $\beta$ -galactosidase pela hidrólise do substrato ONPG

A atividade hidrolítica da  $\beta$ -galactosidase foi determinada a 37 °C em tampão fosfato de potássio 50 mM e pH 6,6. A reação foi conduzida em espectrofotômetro no comprimento de onda de 420 nm. A reação foi conduzida por 2 min, em intervalos de 2 s, utilizando uma solução sintética de ONPG 1,25 mM, em tampão fosfato de potássio 50 mM com MnCl<sub>2</sub> 0,1 mM (DE ALBUQUERQUE *et al.*, 2018; LIMA *et al.*, 2013). Esse procedimento foi utilizado tanto para determinação da atividade da enzima solúvel, quando imobilizada. Para enzima solúvel, utilizou-se um volume de enzima de 50  $\mu$ L, e para determinação da atividade do derivado, utilizou-se uma massa de 0,1 gramas do biocatalisador (DE FREITAS *et al.*, 2020). Uma unidade (U) de  $\beta$ -galactosidase foi definida como a quantidade de enzima necessária para formar 1  $\mu$ mol de *o*-nitrofenol por minuto nas

condições reacionais utilizadas. A Equação 1 apresenta a fórmula utilizada para o cálculo da atividade enzimática.

$$A(U/mL) = \frac{slope \times V_T}{\epsilon \times L \times V_e} \quad (1)$$

sendo, *slope*: absorvância lida pelo tempo;  $V_T$ : o volume total de reação;  $\epsilon$ : o coeficiente de extinção molar do produto *o*-nitrofenol (*o*-NP) (4,53 mol/cm); L: caminho óptico (1 cm) e  $V_e$ : o volume de enzima utilizado.

A Equação 2 foi utilizada para determinação da atividade dos biocatalisadores (ALBUQUERQUE, 2018; LIMA, 2012).

$$A(U/g) = \frac{slope \times V_T}{\epsilon \times L \times m_d} \quad (2)$$

#### 4.2.2 Determinação da atividade de transgalactosilação da $\beta$ -galactosidase

A atividade de transgalactosilação da enzima  $\beta$ -galactosidase de *K. lactis* foi determinada levando-se em conta a produção de lactulose. Na formação da lactulose, uma unidade de ( $U_T$ ) de atividade de transgalactosilação da enzima foi definida como a quantidade de  $\beta$ -galactosidase necessária para catalisar a transgalactosilação de 1  $\mu$ mol de galactose por minuto. Para a reação de transgalactosilação foi utilizada uma metodologia adaptada de Vera e colaboradores (2015), na qual utilizou-se uma mistura equimolar de lactose e frutose, diluídas em 10 g de tampão fosfato de potássio pH 7,0 e 100 mM. A solução enzimática utilizada possuía atividade hidrolítica de 64  $U_H$  para cada grama de lactose oferecida na reação e utilizou-se 2,5 gramas dessa solução para a reação. Os reagentes foram diluídos por meio de aquecimento até a temperatura de 80 °C, na qual não se observou degradação dos açúcares. A reação ocorreu a 50 °C, reatores encamisados de 50 mL, por 15 minutos. Amostras foram retiradas em tempos pré-determinados. A quantidade de galactose transgalactolisada, ou seja, aquela que participou da etapa de formação do complexo enzima-galactosil e seguiu para formação da molécula de lactulose, foi determinada de acordo com o seguinte balanço material: 1 mol de galactose é transgalactolisado para formação de 1 mol de lactulose. O estudo foi feito em duplicata.

### **4.2.3 Imobilização de $\beta$ -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* em quitosana ativada com glutaraldeído**

Primeiramente, o suporte de quitosana foi preparado, adicionando-se a uma solução de ácido acético 2% (v/v) a quitosana na proporção de 2 % (m/v). A mistura foi homogeneizada sob agitação suave e temperatura ambiente. Após completa dispersão da quitosana e ainda sob agitação, adicionou-se uma solução de hidróxido de potássio 5M para que o gel de quitosana coagulasse. Feito isso, a massa de quitosana coagulada foi filtrada e lavada com água destilada em excesso, até atingir pH neutro (BUDRIENE *et al.*, 2005).

Em seguida, o suporte de quitosana foi ativado com uma solução de glutaraldeído 0,8% (v/v). O processo de ativação foi conduzido sob agitação suave e na temperatura de 50 °C por 30 minutos. Ao término dessa etapa, o suporte ativado foi lavado com água destilada em excesso e com tampão fosfato de potássio, 100 mM e pH 7,0 (DE ALBUQUERQUE *et al.*, 2018; LIMA *et al.*, 2013).

Visando melhorar o processo de imobilização, foi realizado um estudo prévio para avaliar a carga ideal para imobilização enzimática. As cargas avaliadas foram 2, 5, 7, 10 e 12 mg de proteína por grama de suporte. O processo de imobilização foi conduzido em agitador rotor (TE-165, Tecnal, SP) por 2 horas em temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C), utilizando tampão fosfato de potássio 100 mM e pH 7,0, com adição de 0,1 mM de  $MnCl_2$  e 0,2 mM de  $MgCl_2$ . A adição desses íons metálicos ajuda na estabilização das subunidades da enzima (já que trata-se de uma enzima multimérica) durante o processo de imobilização (BUDRIENE *et al.*, 2005; DE ALBUQUERQUE *et al.*, 2018).

### **4.2.4 Determinação dos parâmetros de imobilização**

A avaliação da etapa de imobilização foi feita usando os parâmetros descritos a seguir:

- *Atividade oferecida* (U/g): Quantidade de atividade enzimática oferecida por grama de suporte no início da imobilização (Equação 3):

$$A_{oferecida} = \left( \frac{Atividade\ Inicial}{Massa\ de\ Suporte} \right) \times Volume\ da\ solução\ de\ imobilização \quad (3)$$

onde, a atividade inicial se refere à atividade da solução de imobilização.

- *Rendimento de imobilização (%)*: Relação entre a atividade da enzima imobilizada e a atividade oferecida inicialmente (Equação 4):

$$R (\%) = \left( \frac{\text{Atividade inicial} - \text{Atividade sobrenadante}}{\text{Atividade inicial}} \right) \times 100 \quad (4)$$

onde, a atividade imobilizada se refere a diferença entre a atividade inicial e a atividade remanescente no sobrenadante após o processo de imobilização.

- *Atividade teórica (U/g)*: Produto entre a quantidade de atividade oferecida pelo rendimento da imobilização (Equação 5):

$$A_{teórica} = \text{Rendimento} \times A_{oferecida} \quad (5)$$

- *Eficiência (%)*: Após calcular a atividade do biocatalisador e a atividade oferecida é possível determinar o percentual de eficiência, através de uma relação entre esses dois últimos parâmetros, de acordo com a Equação 6 (DE FREITAS *et al.*, 2020).

$$\text{Eficiência} = \frac{A_{biocatalisador}}{A_{teórica}} \times 100 \quad (6)$$

#### **4.2.5 Determinação dos parâmetros de avaliação do processo de hidrólise e de produção de lactulose**

Os parâmetros avaliados nos processos de hidrólise e transgalactosilação foram o percentual de hidrólise da lactose (Equação 7), rendimento de produção de lactulose (Equação 8) e produtividade máxima de lactulose (Equação 9). A seguir estão expressas as equações utilizadas.

- *Percentual de hidrólise da lactose (%)*: Razão entre a quantidade de lactose presente no início da reação (g/L), pela quantidade residual de lactose (g/L), multiplicando por 100.

$$\%_{hidrólise} = \frac{[La]_{inicial} - [La]_{final}}{[La]_{inicial}} \cdot 100 \quad (7)$$

- *Rendimento de produção de lactulose*: Expressa a razão entre a quantidade máxima de lactulose produzida (g/L) pela quantidade de lactose oferecida no início do processo (g/L).

$$\eta_{lactulose} = \frac{[Lu]_{m\acute{a}x}}{[La]_{inicial}} \quad (8)$$

- *Produtividade máxima de lactulose (g/(L.h))*: Relação entre a quantidade máxima de lactulose produzida pelo tempo no qual essa concentração foi obtida.

$$q_{m\acute{a}x} = \frac{[Lu]_{m\acute{a}x}}{t_{[Lu]_{m\acute{a}x}}} \quad (9)$$

#### ***4.2.6 Avaliação da eficiência catalítica dos biocatalisadores obtidos no processo de hidrólise de lactose e produção de lactulose***

Para avaliar a eficiência catalítica dos biocatalisadores obtidos na produção de oligossacarídeos, foram realizadas reações simultâneas de hidrólise da lactose e produção de lactulose. Os experimentos foram conduzidos em frascos de Erlenmeyer de 25 mL contendo a solução sintética de lactose e frutose (1:2), com uma concentração total inicial de substrato de 200 g/L, em tampão fosfato 50 mM e pH 7,0 (DE ALBUQUERQUE *et al.*, 2018). A carga enzimática utilizada foi de 7 U/mL e a reação foi conduzida sob agitação orbital a 120 RPM e 50 °C por 20 min.

#### ***4.2.7 Avaliação da influência dos substratos nas reações de hidrólise e de transgalactosilação através da alteração na razão lactose:frutose***

A fim de se determinar a melhor proporção de lactose:frutose (La:Fru) e entender como tal parâmetro influencia as etapas de hidrólise de transgalactosilação na reação de hidrólise e produção de lactulose, foram avaliadas as razões de La:Fru de 1:1, 1:2, 1:3, 2:1 e 3:1. Amostras foram recolhidas em tempos pré-determinados para avaliação da concentração de lactose, glicose e lactulose, e as reações foram paradas por aquecimento a 100 °C por 1 minuto.

#### **4.2.8 Avaliação da produção de lactulose utilizando soro de leite como substrato**

Após a avaliação da produção de lactulose utilizando uma solução sintética de lactose, avaliou-se a produção de lactulose por  $\beta$ -galactosidase de *K. lactis* utilizando soro de leite como substrato. O soro de leite utilizado era composto por 72% (m/m) de lactose e foi suplementado com a adição de frutose, seguindo a mesma a proporção de 1:2, com concentração máxima inicial de substrato de 200 g/L, em tampão fosfato de potássio 50 mM e pH 7,0. O soro não passou por nenhum processo de precipitação de proteínas, sendo utilizado *in natura*. Os ensaios foram conduzidos em Erlenmeyers de 25 mL contendo o meio reacional. A carga enzimática foi de 7 U/mL (DE ALBUQUERQUE *et al.*, 2018) e a reação foi conduzida sob agitação orbital a 120 RPM e 50 °C por 20 minutos. Amostras foram retiradas em tempos pré-determinados e a reação foi parada por aquecimento a 100 °C por 1 minuto.

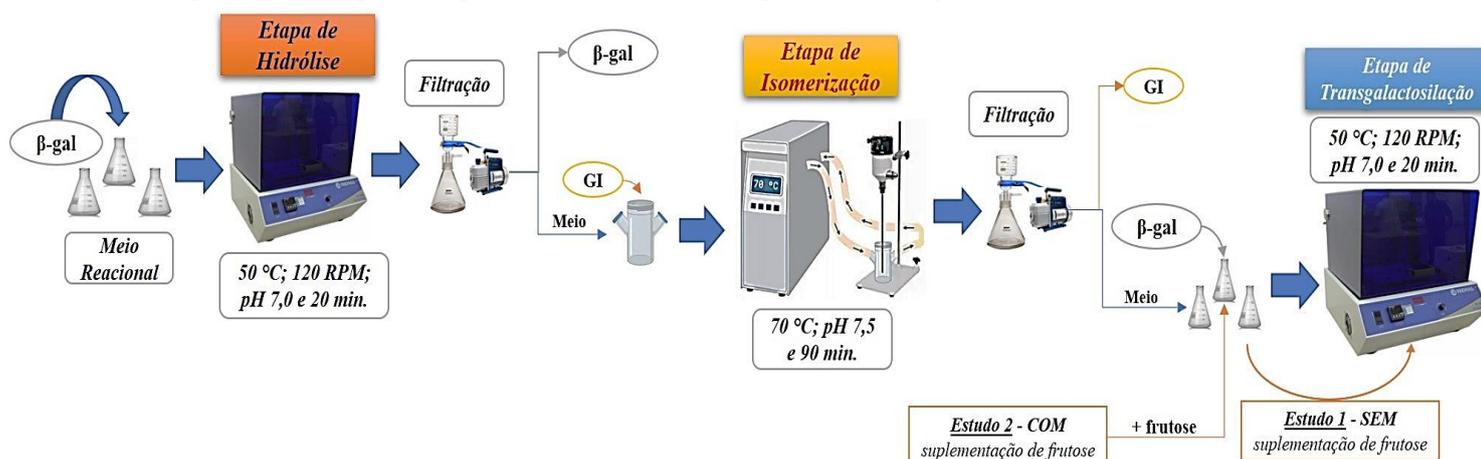
#### **4.2.9 Avaliação da configuração operacional do processo de produção de lactulose por $\beta$ -galactosidase de *K. lactis* e o uso da glicose-isomerase de *Streptomyces murinus* para otimizar o processo**

No intuito de se otimizar o processo de produção da lactulose por  $\beta$ -galactosidase de *K. lactis*, foram avaliadas algumas configurações reacionais do processo. Além disso, um estudo utilizando a enzima glicose-isomerase de *Streptomyces murinus* para atuar no processo de isomerização da glicose (proveniente da hidrólise da lactose) em frutose e ser usada na reação de transgalactosilação juntamente com a galactose.

A seguir, a Figura 11 apresenta o esquema da conformação proposta para processo A. Neste, em um primeiro momento ocorre a reação de hidrólise da lactose, no tempo de 20 minutos, nas condições de 50 °C, 120 RPM em tampão fosfato de potássio 50 mM e pH 7,0. Em seguida, removeu-se  $\beta$ -galactosidase (já imobilizada) e adicionou-se a glicose-isomerase (já imobilizada) no intuito de se produzir frutose a partir da glicose residual da primeira etapa da reação. Assim, o procedimento de isomerização utilizou uma massa de 0,5 gramas de glicose-isomerase liofilizada (aproximadamente 350 U/g) para cada 20 mL de meio, a 70 °C, em tampão fosfato de potássio 100 mM e pH 7,5, sob agitação mecânica suave, durante 90 min. Após isso, a  $\beta$ -galactosidase retornou ao reator para seguir com a reação de transgalactosilação. Um segundo estudo utilizando essa mesma

configuração operacional foi realizado, porém utilizando um biocatalisador de  $\beta$ -galactosidase novo.

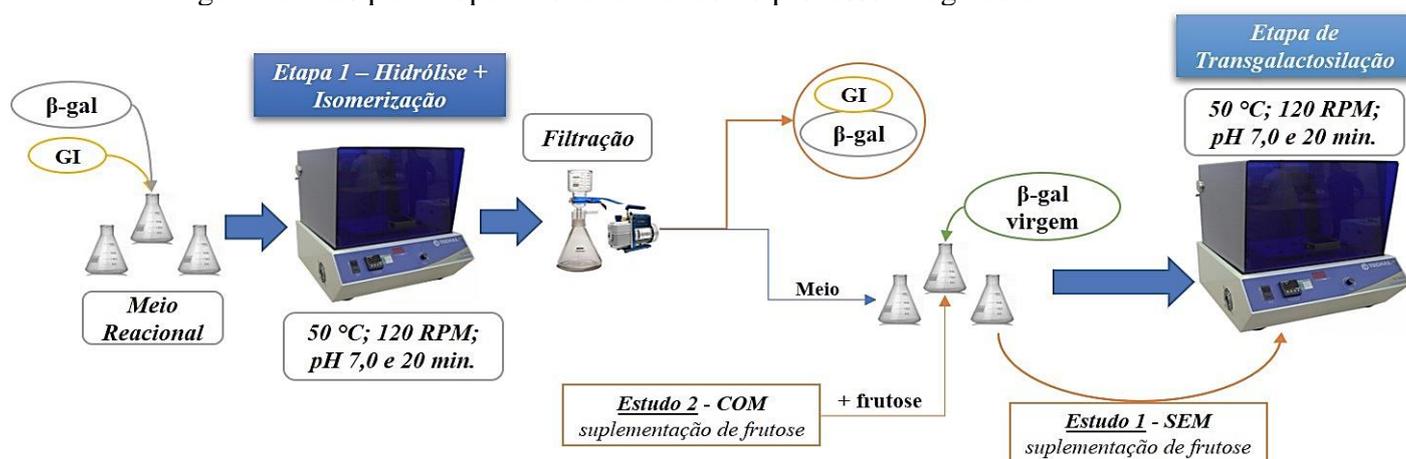
Figura 11 – Esquema operacional utilizado no processo integrado A.



Fonte: O Autor (2021).

O processo B avaliou o uso dos dois biocatalisadores de forma simultânea no mesmo reator. Assim, a primeira etapa do processo investigou o processo de hidrólise e isomerização ao mesmo tempo, ou seja, ao passo que glicose era liberada no meio, proveniente da hidrólise da lactose, a glicose-isomerase já atuaria convertendo-a em frutose. Para essa etapa, optou-se por utilizar as melhores condições do processo de hidrólise, ou seja, 50 °C, tampão fosfato de potássio 50 mM e pH 7,0, agitação de 120 RPM e tempo de reação de 90 min. A proporção de glicose-isomerase utilizada foi a mesma do processo anterior. Ao término dessa etapa, as enzimas foram retiradas do reator e uma nova  $\beta$ -galactosidase de *K. lactis* imobilizada em quitosana ativada com glutaraldeído 0,8 % (v/v) foi adicionado para realizar a reação de transgalactosilação. Também foram realizados estudos com e sem suplementação de frutose para etapa de transgalactosilação. A Figura 12 apresenta um esquema do processo proposto.

Figura 12 – Esquema operacional utilizado no processo integrado B.



Fonte: O Autor (2021).

#### 4.2.10 Avaliação da redução da carga de proteína por grama de suporte para otimização da produção de oligossacarídeos

Um estudo de redução da quantidade de enzima oferecida (em mg) por grama de suporte foi realizado, a fim de se avaliar se tal redução teria influência sobre o processo de produção de oligossacarídeos. As condições de imobilização utilizadas foram as mesmas descritas no tópico 4.2.1. Partiu-se da carga de 7 mg/g como sendo o valor de 100 % da carga de enzima por grama de suporte, reduzindo-se tal parâmetro em 75, 50, 25 e 10 %. As condições reacionais utilizadas também foram as mesmas descritas no tópico 4.2.6. Amostras foram retiradas em tempos pré-estabelecidos e levadas para análise dos carboidratos. O estudo foi feito em triplicata.

#### 4.2.11 Comparação entre o uso de $\beta$ -galactosidases de *K. lactis* e *A. oryzae*

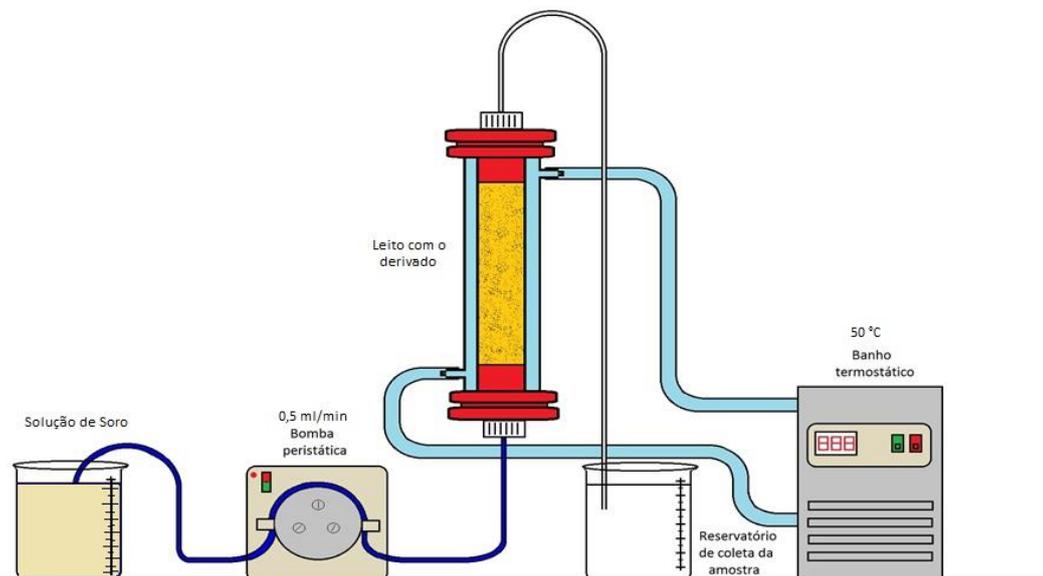
Com o intuito de se avaliar a influência da mudança da cepa de origem no processo de hidrólise e produção de oligossacarídeos, realizou-se um estudo comparativo entre as  $\beta$ -galactosidases de *K. lactis* e *A. oryzae*. As condições reacionais foram as mesmas descritas nos tópicos anteriores (tópico 4.5.6). O ensaio foi feito em duplicata e amostras foram retiradas em tempos pré-determinados para análise de carboidratos por CLAE.

#### ***4.2.12 Avaliação do processo de hidrólise da lactose do soro de leite por $\beta$ -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* em reator de leito fixo***

Os estudos apresentados a seguir têm o intuito de avaliar o uso de leito fixo para o processo de hidrólise do soro de leite por  $\beta$ -galactosidase de *K. lactis*, imobilizada em quitosana ativada com glutaraldeído 0,8% (v/v), a fim de se avaliar se a mudança de reatores melhoraria o desempenho da reação, em especial na etapa de transgalactosilação. Para isso, uma coluna de leito fixo (Pyrez C 10/10, GE Healthcare, Chicago, IL) foi empacotada com  $\beta$ -galactosidase imobilizada até a altura fixada em 3 centímetros e diâmetro de 1 cm. A massa de derivado utilizada para essa altura foi de 2,0 g. O biocatalisador foi reservado por um curto tempo em tampão fosfato de potássio 100 mM e pH 7,0, pois o suporte utilizado pode intumescer em meio líquido, interferido no processo de empacotamento. Após o empacotamento da coluna, injetou-se o mesmo tampão no leito, por um período de tempo de 1 hora, na vazão de 1 mL/min.

Após o processo de pré-adaptação do leito, uma solução de soro de leite 72% (m/v) de lactose foi injetada no leito por um período de 10 horas, na vazão de 0,5 mL/min. A temperatura do leito foi controlada através de banho termostático a 50 °C. Alíquotas foram retiradas de tempos pré-definidos para análise de carboidratos. A Figura 13 apresenta um esquema utilizada para a hidrólise do soro de leite em reator de leito fixo.

Figura 13 – Esquema operacional para o processo de hidrólise do soro de leite em leito fixo, utilizando  $\beta$ -galactosidase de *K. lactis* imobilizada em quitosana ativada com glutaraldeído 0,8 (v/v).



Fonte: Adaptado de Silva (2013).

## 4.3 Métodos analíticos

### 4.3.1 Determinação da concentração de proteínas

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).

### 4.3.2 Quantificação dos carboidratos

Os carboidratos presentes e produzidos durante as reações avaliadas (lactose, lactulose, glicose, galactose e frutose) 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 uma coluna Supelco 610-H a 30 °C. A fase móvel utilizada foi solução de ácido fosfórico ( $H_3PO_4$ ) 0,1% (v/v), a uma taxa de fluxo de  $0,5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  e 30 °C. Também foram realizadas análises de CLAE dos mesmos carboidratos, mas em especial para identificar e quantificar a produção de rafinose e estaquiose, utilizando CLAE (Waters, Milford, MA, USA), com detector de índice de refração Waters (Modelo 2414), acoplado à uma coluna BP-100  $Ca^{2+}$  a 80 °C. A

fase móvel utilizada foi água Milli-Q, numa taxa de fluxo de 0,4 mL/min. O volume de injeção foi de 20  $\mu$ L e os padrões usados foram obtidos da Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO).

#### ***4.3.3 Análises estatísticas***

Os dados experimentais foram analisados estatisticamente utilizando uma análise de variância (ANOVA) com nível de confiança de 95% e uma probabilidade de 5% ( $p < 0,05$ ). Testes de *Tukey* foram utilizados para avaliar a diferença significativa entre parâmetros avaliados do processo de hidrólise e produção de lactulose.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Processo de imobilização

O Grupo de Pesquisa em Processos Biotecnológicos – GPBio, da Universidade Federal do Ceará, já estudou o processo de imobilização da enzima  $\beta$ -galactose usando quitosana ativada com glutaraldeído como reportado em estudos prévios (DE FREITAS *et al.*, 2020; LIMA *et al.*, 2013), mas não foi avaliada a carga de proteína no processo de imobilização e sua influência nos parâmetros de imobilização. Então, inicialmente nesta pesquisa avaliou-se as cargas de 2, 5, 7, 10 e 12 mg de proteína por grama de suporte oferecido, antes dos estudos para o aprimoramento das condições operacionais para produção dos oligossacarídeos. Os resultados obtidos estão expressos na Tabela 7.

Tabela 7 – Parâmetros de imobilização de  $\beta$ -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* em quitosana ativada com glutaraldeído 0,8% (v/v) obtidos no processo realizado a pH 7,0 e 25 °C em tampão fosfato de potássio 100 mM com  $MnCl_2$  0,1 mM e  $MgCl_2$  0,2 mM, sob agitação suave por 2 horas.

<b>Carga Enzimática (mg/g)</b>	<b>Atividade Oferecida (U/g)</b>	<b>Rendimento de Imobilização (%)</b>	<b>Atividade Teórica (U/g)</b>	<b>Eficiência da Imobilização (%)</b>	<b>Atividade do Biocatalisador (U/g)</b>
2	192,33 ± 4,48	99,30 ± 1,86	188,60 ± 11,62	2,93 ± 0,12	5,70 ± 1,14
5	493,91 ± 12,40	94,38 ± 0,18	458,17 ± 28,85	7,22 ± 0,44	35,53 ± 1,12
7	714,80 ± 27,62	88,59 ± 0,21	604,20 ± 19,54	6,20 ± 0,14	44,29 ± 0,95
10	967,84 ± 40,85	84,64 ± 0,33	834,07 ± 12,33	4,57 ± 0,16	44,07 ± 1,13
12	1192,89 ± 25,60	72,71 ± 0,98	857,38 ± 11,33	2,87 ± 0,18	34,16 ± 2,62

Fonte: O Autor (2020).

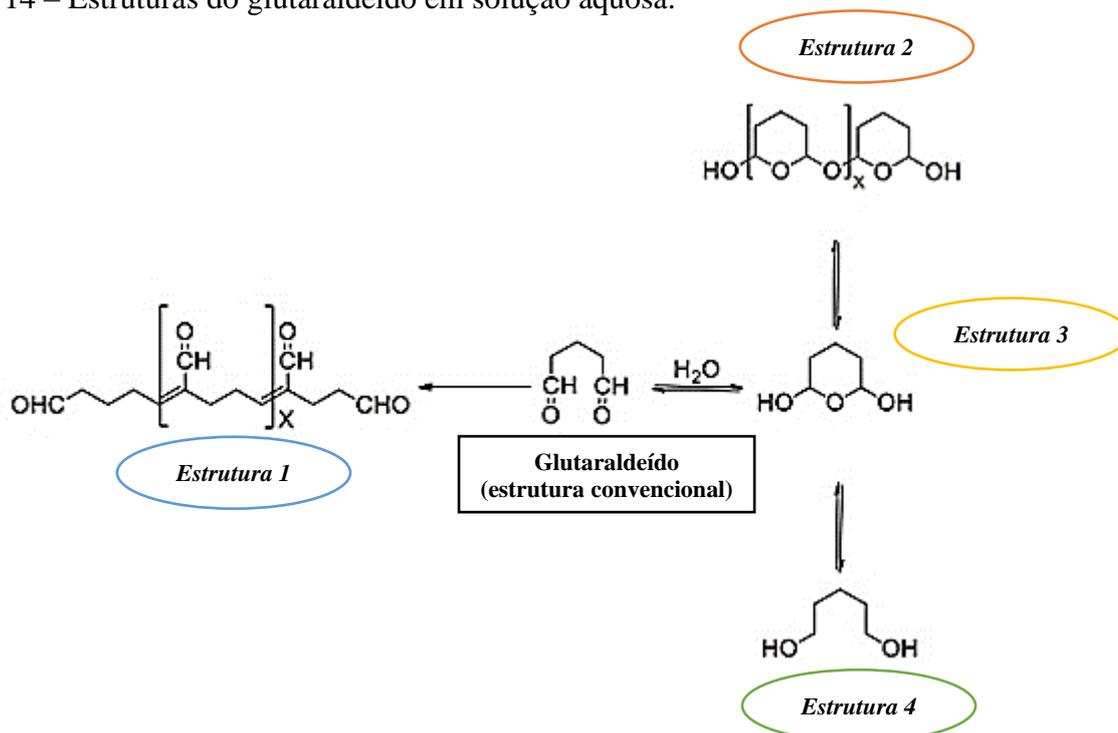
A análise dos parâmetros obtidos permite concluir que as cargas de 7 e 10 mg/g foram as que resultaram na obtenção de um biocatalisador com maior atividade (44,29 e 44,07 U/g, respectivamente). Nas concentrações mais baixas avaliadas (2 e 5 mg/g) nota-se que o rendimento de imobilização foi acima de 90%, já que uma menor quantidade de proteína foi oferecida para uma quantidade fixa de suporte. Tal comportamento não é observado na carga de 12 mg/g, já que uma maior quantidade de proteína é oferecida na imobilização. Isso mostra que oferecer uma quantidade de proteína maior que 10 mg/g pode gerar um desperdício de enzima. Uma análise dos parâmetros obtidos nas cargas de 5, 7 e 10 mg/g aponta que um possível valor ótimo de carga estaria entre 5 e 7 mg/g. Analisando do ponto de vista da eficiência de imobilização, percebe-se que um aumento de quase 150 % quando a carga de imobilização passou de 2 para 5 mg/g, indicando que um maior percentual de enzima ativa se ligou ao suporte, gerando um biocatalisador com maior atividade. A partir da carga de 5 mg/g, a eficiência da imobilização passa a diminuir em aproximadamente 14 %, para a carga de 7 mg/g, e aproximadamente em 36 %, para a carga de 10 mg/g. Tal redução também é observada analisando os valores da atividade recuperada para cada carga avaliada. O que se percebe é a obtenção de biocatalisadores mais ativos, no entanto, obtidos através de um processo de imobilização menos eficiente, pois nem toda enzima é direcionada para imobilização no suporte. Provavelmente, essa perda de atividade da enzima deve-se a algum processo de inativação enzimática sofrido ao longo da imobilização. Assim, a carga de 7 mg/g foi a selecionada e utilizada para os experimentos envolvendo a hidrólise da lactose e produção de lactulose.

O aumento da atividade com o aumento da carga enzimática pode ser devido a alterações conformacionais ocasionadas pelas ligações formadas entre a enzima e o suporte ativado com glutaraldeído, ocasionando em uma maior exposição de sítios ativos enzimáticos. Além de promover a ligação multipontual da enzima com o suporte, o glutaraldeído também pode levar a essas alterações conformacionais, que ocasionam, em certos casos, uma maior exposição do sítio catalítico da enzima (BARBOSA *et al.*, 2014). No entanto, essas distorções também podem ocasionar reduções na atividade enzimática, como observado na carga de 12 mg/g, mas com uma compensação em outros fatores, como por exemplo a estabilidade da enzima no suporte. Tal estabilidade pode ser ocasionada como consequência de mais pontos de amarração da enzima ao suporte, que podem ocasionar distorções na estrutura enzimática, dificultando o acesso do substrato ao sítio catalítico (BOUDRANT; WOODLEY; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2020). Além disso, ao levar em

conta o valor do rendimento de imobilização da carga de 12 mg/g (72 %), observa-se que uma menor quantidade de enzima foi imobilizada ao suporte, em comparação com as demais cargas avaliadas. Provavelmente, ocorreu uma saturação do suporte, o qual, nas condições de imobilização avaliadas, não foi capaz de imobilizar toda a enzima oferecida (SUÁREZ *et al.*, 2018).

O processo de imobilização de enzimas em quitosana é possível devido à presença de grupamento hidroxila e aminas primárias presentes em sua estrutura polimérica. Isso permite que a enzima possa ser ligada de forma covalente ao suporte, devido aos resíduos de aminoácidos presentes ao longo da superfície enzimática (em especial, resíduos de lisina e aminas terminais). A ativação com glutaraldeído fornece à superfície do suporte grupamentos aldeídos que irão fornecer mais pontos de ligação da enzima com o suporte, já que existirão pontos de amarração da enzima com grupos funcionais do suporte e da enzima com os grupos aldeídos obtidos da ativação com glutaraldeído. Urrutia e colaboradores (2018) avaliaram o processo de imobilização de  $\beta$ -galactosidase de *Aspergillus oryzae* em suportes de quitosana ativada com glutaraldeído e com epicloridrina, este último através de 2 processos distintos: de uma (apenas ligação covalente) e de duas etapas (uma adsorção seguida de ligação covalente). Os resultados obtidos mostraram que o suporte ativado com glutaraldeído apresentou resultados superiores de rendimento de imobilização por proteína e por atividade, quando comparado com os resultados obtidos no processo de uma etapa de imobilização no suporte de quitosana ativada com epicloridrina. Os autores associaram os resultados com a versátil química do glutaraldeído, a qual é diretamente afetada pelo pH do meio e a quantidade de glutaraldeído presente na solução. A ativação de suportes aminados, como a quitosana, com glutaraldeído em pH 7,0 (que também foi o utilizado no presente estudo) envolve diversas formas estruturais deste reagente, as quais podem gerar diferentes conformações de biocatalisadores, afetando ou não, a disponibilidade do sítio ativo enzimático e, assim, a eficiência do biocatalisador (MONSAN, 1978; URRUTIA, Paulina *et al.*, 2018). A Figura 14 apresenta um esquema das diferentes formas que o glutaraldeído pode apresentar quando em solução aquosa.

Figura 14 – Estruturas do glutaraldeído em solução aquosa.



Fonte: Adaptado de Barbosa et al. (2014).

Além de envolver as diferentes formas do glutaraldeído, a ativação desses tipos de suportes pode resultar em diferentes mecanismos de imobilização dependendo das condições utilizadas durante a imobilização, não contemplando apenas o mecanismo por formação de bases de Schiff, comum nesse tipo de procedimento (URRUTIA, *et al.*, 2018). Por ser comumente utilizado para ativação de suportes aminados, pode ocorrer que cada molécula de glutaraldeído esteja ligada a um ou dois grupos amina, conferindo também, características de suportes de troca iônica. Por esse motivo, os suportes aminados ativados com glutaraldeído podem ser considerados matrizes heterofuncionais, sendo mais eficazes no processo de imobilização enzimática (BETANCOR *et al.*, 2006).

## 5.2 Avaliação da razão lactose:frutose na hidrólise da lactose e na produção de lactulose

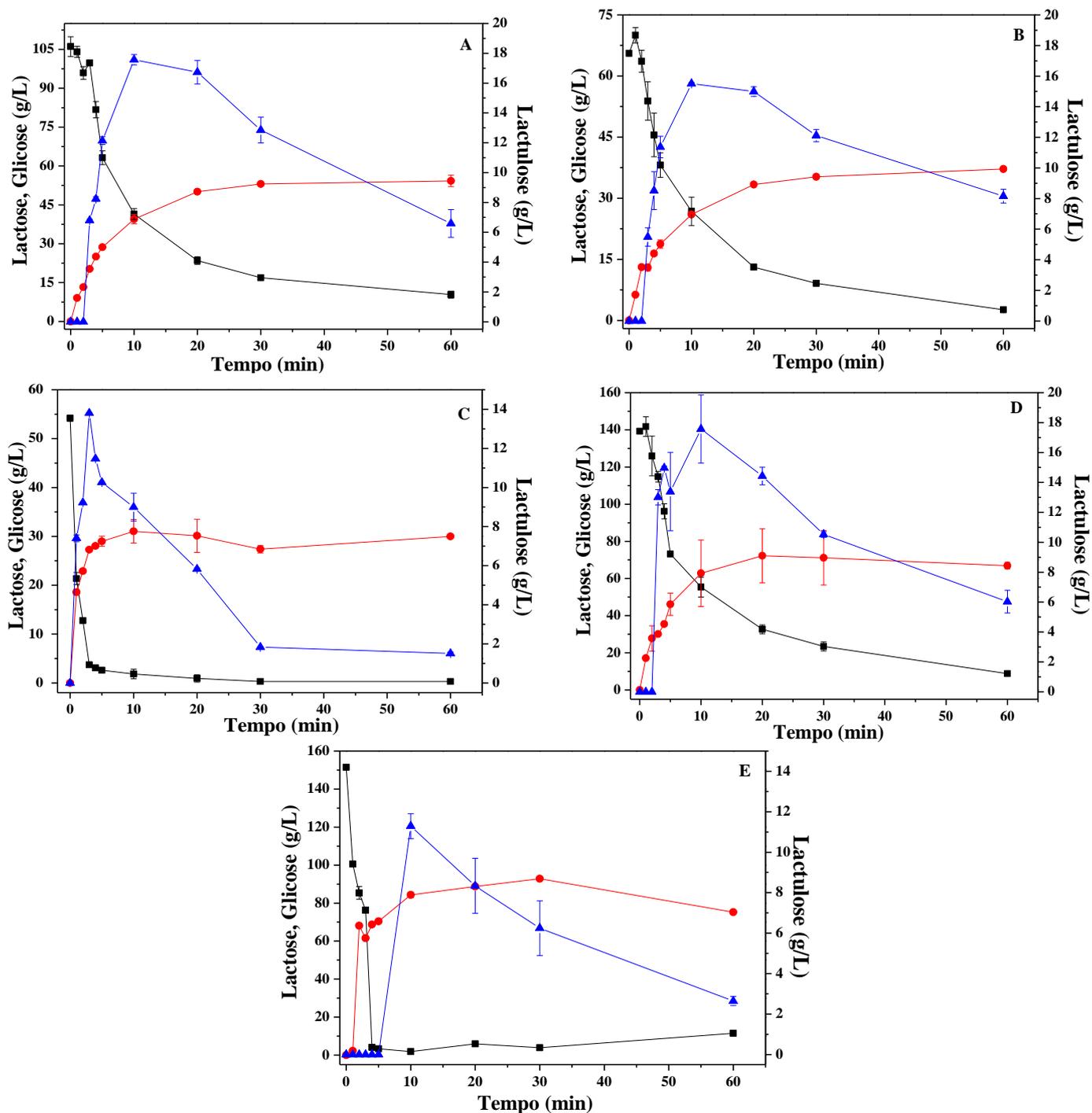
Com o intuito de avaliar a melhor proporção de substrato utilizado para os processos de hidrólise e de produção de lactulose, estudos variando-se as proporções iniciais de substrato foram realizados em duas etapas: (i) estudos envolvendo lactose pura e (ii) e envolvendo o soro de leite, mantendo-se a concentração máxima de açúcares em 200 g/L ( $\pm$

10 g/L) (DE ALBUQUERQUE *et al.*, 2018). Os resultados obtidos estão expressos e discutidos nos tópicos seguintes.

### ***5.2.1 Estudos com lactose pura***

A influência da razão inicial lactose:frutose na produção de lactulose no processo usando lactose pura está apresentado na Figura 15.

Figura 15 – Efeito da razão lactose:frutose no processo de hidrólise da lactose e produção de lactulose por  $\beta$ -galactosidase de *K. lactis* livre, utilizando lactose pura como substrato. Razão 1:1 (A); razão 1:2 (B); razão 1:3 (C); razão 2:1 (D) e razão 3:1 (E). Condições reacionais: concentração total de substrato = 200 g/L ( $\pm 10$  g/L); tampão fosfato de potássio pH 7 e 50 mM; 50 °C; 120 RPM e 60 minutos. Lactose (■), glicose (●) e lactulose (▲).



Fonte: O Autor (2020).

A partir da análise da Figura 15 pode-se perceber que a variação da razão de substrato influencia diretamente o processo de hidrólise e produção de lactulose. No primeiro estudo (La:Fru = 1:1), o percentual de hidrólise foi de 90,23 %. Já no segundo estudo (La:Fru = 1:2), observou-se um aumento de aproximadamente 17 % nesse mesmo percentual (96,02 %), com uma mínima variação no terceiro estudo (La:Fru = 1:3), com um percentual de hidrólise de 95,23 %. A partir do quarto estudo, onde fixa-se a proporção de frutose no meio e aumenta a quantidade de lactose, percebe-se que o percentual hidrolítico começa a cair, primeiramente para 93,70 % no quarto estudo (La:Fru = 2:1), chegando até 92,42 % no quinto estudo (La:Fru = 3:1). Do ponto de vista do processo hidrolítico, percebe-se que uma maior quantidade de frutose no meio favorece a hidrólise. As pequenas variações no percentual hidrolítico, observadas com o aumento na quantidade de lactose, podem ser explicadas devido à saturação desse açúcar no meio reacional, levando a sua precipitação espontânea (VERA *et al.*, 2012). Esse fato também foi observado nos experimentos realizados com concentrações de lactose mais elevadas. Com menos lactose solubilizada no meio é esperado que o percentual hidrolítico diminua. No entanto, comparando-se a razão de 1:1 com a de 3:1, tal parâmetro ainda se mostra superior. Isso pode ser explicado devido ao fato de que, apesar de chegar na concentração de saturação, existe ainda um percentual maior de lactose disponível para hidrólise pela enzima. Por esse motivo, a diferença entre os valores de hidrólise é mínima (apenas 2,4%).

Avaliando-se a influência da razão inicial de lactose:frutose na produção de lactulose, percebe-se que a máxima produção foi obtida nas razões de 1:1 e 2:1 (17,57 g/L em ambas). Na razão de 1:2 e 1:3, obteve-se 15,51 e 13,81 g/L de lactulose, respectivamente, possivelmente um aumento na concentração de frutose no meio também afetou a atividade de transgalactosilação da enzima. Estes valores são inferiores aos obtidos na razão 1:1 e 2:1, mas ao analisar a quantidade de lactulose produzida em relação à quantidade de lactose oferecida no início de cada reação, percebe-se que a maior produção de lactulose por grama de lactose foi obtida na razão com a maior quantidade de frutose no meio (1:3).

A Tabela 8 apresenta os parâmetros obtidos para cada uma das razões avaliadas no processo de hidrólise da lactose e produção de lactulose utilizando a enzima livre com lactose pura.

Tabela 8 – Influência da variação na razão inicial lactose:frutose na reação de hidrólise da lactose e produção de lactulose, utilizando lactose pura e  $\beta$ -galactosidase de *K. lactis* livre. Condições reacionais: concentração total de substrato = 200 g/L; tampão fosfato de potássio 50 mM e pH 7,0; 7 U/mL, 50 °C e 120 RPM por 10 minutos. Letras iguais representam que não houve diferença estatística significativa entre os parâmetros avaliados em um nível de confiança de 5 %.

<b>Razão La:Fru (m/m)</b>	<b>Hidrólise da lactose (%)</b>	<b>Produção máxima de lactulose (g/L)</b>	<b>Y<sub>lactulose</sub> (g<sub>lactulose</sub>/g<sub>lactose</sub>)</b>	<b>Q<sub>máx</sub> (g/L.min)</b>
1:1	90,23 ± 3,02 <sup>a</sup>	17,57 ± 0,35 <sup>a</sup>	0,15 ± 0,01 <sup>a</sup>	1,75 ± 0,03 <sup>a</sup>
1:2	96,02 ± 1,77 <sup>b</sup>	15,51 ± 0,09 <sup>b</sup>	0,20 ± 0,01 <sup>a</sup>	1,55 ± 0,01 <sup>b</sup>
1:3	95,23 ± 0,59 <sup>b</sup>	13,81 ± 0,03 <sup>b</sup>	0,21 ± 0,06 <sup>a</sup>	2,86 ± 0,01 <sup>c</sup>
2:1	93,70 ± 3,09 <sup>a,b</sup>	17,57 ± 1,28 <sup>a</sup>	0,12 ± 0,01 <sup>a,b</sup>	1,76 ± 0,23 <sup>a</sup>
3:1	92,42 ± 0,37 <sup>b</sup>	11,29 ± 0,62 <sup>c</sup>	0,07 ± 0,01 <sup>b</sup>	1,13 ± 0,06 <sup>d</sup>

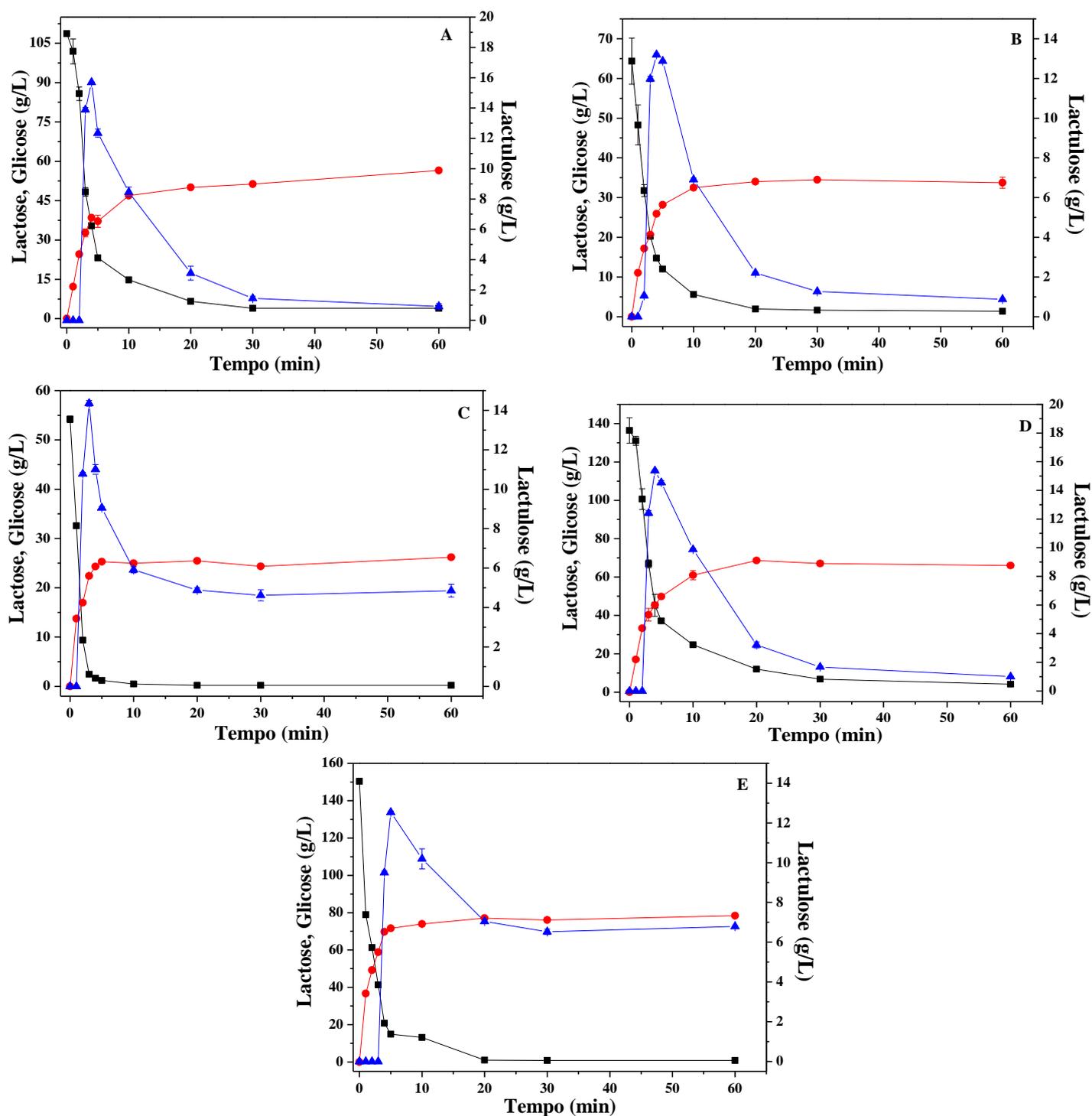
Fonte: O Autor (2020).

A análise da Tabela 8 permite observar que apesar de obter um valor inferior de concentração máxima de lactulose, quando comparado as demais razões avaliadas, a razão de 1:3 apresentou um rendimento de produção de lactulose por quantidade de lactose oferecida maior que os demais valores. Isso mostra que a quantidade de frutose no meio também influenciou diretamente a produção de lactulose. Até então, percebe-se que existe uma influência maior por parte do agente receptor do complexo galactosil-transferase (nesse caso, a frutose), do que do agente doador do íon galactosil (no caso, a lactose), tanto no processo de hidrólise quanto na produção de lactulose. Essa influência que a concentração dos substratos exercem sobre as atividades hidrolítica e de transgalactosilação da enzima indica que o processo em questão se trata de uma reação cineticamente controlada (VERA *et al.*, 2020), em especial, no que diz respeito a transgalactosilação, com a frutose agindo como aceptor galactosil, enquanto que a lactose pode agir tanto como doador como aceptor do complexo galactosil-transferase. Essa característica faz com que sejam formados tanto galactooligossacarídeos como frutooligossacarídeos, fazendo com que a razão entre lactose e frutose seja determinante na composição final do meio reacional (ABURTO *et al.*, 2020).

A redução observada no percentual hidrolítico ao comparar-se as razões com maior quantidade de lactose, pode ser devido ao desfavorecimento da atividade hidrolítica da enzima, justificável pelo aumento do agente acceptor do galactosil, favorecendo a transgalactosilação. Fato esse corroborado pelo valor observado nos rendimentos de produção de lactulose por grama de lactose. Apesar de apresentar um valor menor de concentração máxima de lactulose em relação ao valor obtido na razão de 2:1 e 1:1, não se pode concluir que a atividade de transgalactosilação foi reduzida, já que esse tipo de reação favorece não somente à formação de lactulose, mas também a de outros oligossacarídeos (GUERRERO *et al.*, 2011; GUERRERO; VERA; CONEJEROS; *et al.*, 2015; VERA *et al.*, 2020).

Uma das estratégias utilizadas em processos bioquímicos para se otimizar a capacidade catalítica de um biocatalisador é a sua imobilização em um suporte. A seguir, a Figura 16 apresenta os resultados obtidos para esse mesmo estudo, utilizando  $\beta$ -galactosidase de *K. lactis* imobilizada em quitosana ativada com glutaraldeído.

Figura 16 - Efeito da razão lactose:frutose no processo de hidrólise e produção de lactulose por  $\beta$ -galactosidase de *K. lactis* imobilizada em quitosana ativada com glutaraldeído e utilizando lactose pura como substrato. Razão 1:1 (A); razão 1:2 (B); razão 1:3 (C); razão 2:1 (D) e razão 3:1 (E). Condições reacionais: concentração total de substrato = 200 g/L ( $\pm$  10 g/L); tampão fosfato de potássio pH 7 e 50 mM; 50 °C e 120 RPM. Lactose (■), glicose (●) e lactulose (▲).



Fonte: O Autor (2020).

Ao se analisar resultados obtidos, nota-se que o maior percentual hidrolítico (97,86%) foi obtido na razão de 1:2, no entanto, nas demais razões os percentuais se mantiveram acima dos 90%. Comparando-se esses resultados com os resultados obtidos estudando a enzima livre (Figura 15), pode-se concluir que não há alterações significativas do ponto de vista da eficiência hidrolítica da enzima. A tendência em favorecer a hidrólise da lactose pode ser notada nos perfis de consumo de lactose observados tanto nos estudos com enzima livre quanto nos estudos com enzima imobilizada. Isso corrobora com a hipótese de que a fonte da enzima tem uma influência de tendência direta sobre qual atividade será favorecida. Nesse caso,  $\beta$ -galactosidases de *K. lactis* tendem a apresentar esse comportamento, devido à facilidade de se ligar a compostos específicos durante seu estado de transição, formando um complexo enzima-substrato mais estável (KACZYŃSKI; CAIS-SOKOLIŃSKA; SZWENGIEL, 2019; YIN *et al.*, 2017). Essa tendência ocorre devido a resíduos aminoácidos presentes especificamente no *loop* 420-443, o qual é exclusivo de  $\beta$ -galactosidases de *K. lactis* (GUERRERO; VERA; CONEJEROS; *et al.*, 2015; PEREIRA-RODRÍGUEZ *et al.*, 2012). Já se sabe que a fonte da enzima é um dos fatores determinantes na hora de se avaliar qual atividade será mais favorecida e que enzimas provenientes dos microrganismos *K. lactis* e *K. fragilis* tendem a favorecer o processo hidrolítico por possuírem uma afinidade maior pela lactose como agente doador de elétrons (DE ANDRADE *et al.*, 2020; SPOHNER *et al.*, 2016; ZHU, FAN *et al.*, 2018). Além disso, o fato da capacidade hidrolítica prevalecer sobre a de transgalactosilação, essa última não é anulada, uma vez que a produção de lactulose também é observada. Na verdade, o que pode se esperar é que haja um balanço entre essas duas atividades, através de alterações nas concentrações do agente doador do íon galactosil, caracterizando uma reação cineticamente controlada também usando a enzima na sua forma imobilizada (BOON; VANT RIET; JANSSEN, 2000; GUERRERO *et al.*, 2011; GUERRERO; VERA; CONEJEROS; *et al.*, 2015). A Tabela 9 apresenta um resumo dos resultados obtidos no processo utilizando  $\beta$ -galactosidase de *K. lactis* imobilizada em quitosana ativada com glutaraldeído.

Tabela 9 – Influência da variação na razão inicial lactose:frutose na reação de hidrólise da lactose e produção de lactulose, utilizando lactose pura e  $\beta$ -galactosidase de *K. lactis* imobilizada em quitosana ativada com glutaraldeído. Condições reacionais: concentração total de substrato = 200 g/L ( $\pm$  10 g/L); tampão fosfato de potássio 50 mM e pH 7,0; 7 U/mL, 50 °C e 120 RPM. Letras iguais representam que não houve diferença estatística significativa entre os parâmetros avaliados em um nível de confiança de 5 %.

Razão La:Fru (m/m)	Hidrólise da lactose (%)	Produção máxima de lactulose (g/L)	$Y_{\text{lactulose}}$ (g <sub>lactulose</sub> /g <sub>lactose</sub> )	$Q_{\text{máx}}$ (g/L.min)
1:1	96,36 $\pm$ 1,84 <sup>a</sup>	15,70 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>	0,14 $\pm$ 0,00 <sup>a</sup>	3,92 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>
1:2	97,86 $\pm$ 0,96 <sup>a</sup>	13,20 $\pm$ 0,06 <sup>b</sup>	0,21 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	3,30 $\pm$ 0,02 <sup>a, c</sup>
1:3	97,76 $\pm$ 0,11 <sup>a</sup>	14,36 $\pm$ 0,15 <sup>c</sup>	0,22 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>	4,78 $\pm$ 0,05 <sup>a, b</sup>
2:1	96,94 $\pm$ 1,39 <sup>a</sup>	15,37 $\pm$ 0,06 <sup>d</sup>	0,12 $\pm$ 0,01 <sup>a, c</sup>	3,84 $\pm$ 0,02 <sup>b, c</sup>
3:1	96,48 $\pm$ 0,158 <sup>a</sup>	12,54 $\pm$ 0,06 <sup>e</sup>	0,07 $\pm$ 0,00 <sup>d</sup>	2,51 $\pm$ 0,01 <sup>c</sup>

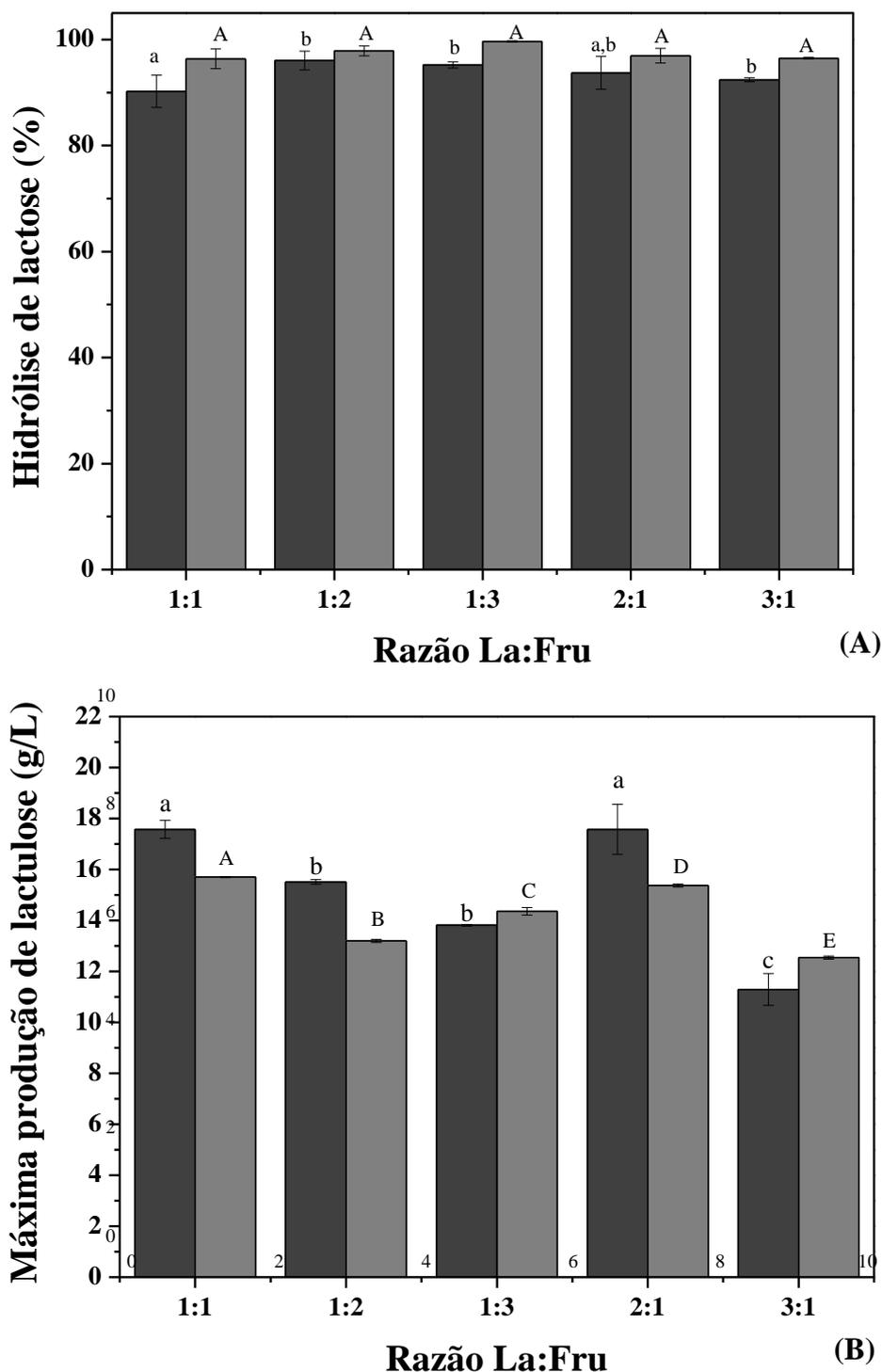
Fonte: O Autor (2021).

Uma semelhança entre a tendência observada nos resultados obtidos nos estudos utilizando enzima livre é percebida ao avaliar os dados presentes na Tabela 9. Existe um pequeno aumento no percentual de lactose hidrolisada em todas as razões avaliadas, no entanto, pouco considerável para se afirmar que houve uma alteração significativa devido à imobilização. Os altos índices de hidrólise obtidos também são em decorrência da fonte da enzima. Como mencionado acima, essa afinidade hidrolítica pela lactose tem relação direta com a estrutura da enzima, em especial, com a inserção no *loop* 420-443 do seu sítio catalítico. Essa “dobra” exclusiva possui resíduos de aminoácidos que têm uma afinidade específica pela lactose, tais como Glu431, Tyr440 e Lys436 (ácido glutâmico, tirosina e lisina, respectivamente), que desempenham um papel importante no reconhecimento de moléculas de lactose, que aumentando a especificidade da enzima por esse substrato (PEREIRA-RODRÍGUEZ *et al.*, 2012; RODRÍGUEZ *et al.*, 2008). De forma semelhante também, o rendimento de produção de lactulose foi superior na razão de 1:3 (0,22 g<sub>lactulose</sub>/g<sub>lactose</sub>). É importante destacar que enzimas capazes de hidrolisar a lactose e atuar na transgalactosilação, também podem atuar na hidrólise reversa dos compostos formados

através das reações de transgalactosilação, desde que haja uma especificidade enzimática pelos compostos formados, dentre eles a própria lactulose (FISCHER; KLEINSCHMIDT, 2018). Por esse motivo, provavelmente, observa-se um bom rendimento de produção de lactulose por lactose oferecida, mas com uma menor concentração máxima de lactulose obtida, em relação à razão de 1:2. Uma maior quantidade de frutose no meio favorece as reações de transgalactosilação, as quais podem formar outros tipos de galactooligossacarídeos, não apenas a lactulose. No entanto, como temos uma enzima com uma alta capacidade hidrolítica, existe também a hipótese de que uma hidrólise reversa ocorra, quebrando a lactulose formada e liberando mais galactose no meio para formação de outros oligossacarídeos. De fato, observa-se a redução na concentração de lactulose ao longo do tempo de reação.

A seguir, a Figura 17 apresenta uma comparação entre os percentuais hidrolíticos e a produção de lactulose entre os estudos com enzima livre e os estudos com enzima imobilizada, ambos utilizando lactose pura.

Figura 17 – Comparativo entre os resultados obtidos no processo de hidrólise da lactose (A) e produção de lactulose (B) utilizando  $\beta$ -galactosidase de *K. lactis* livre (barra cinza escuro, ■) e imobilizada (barra cinza claro, ▒) em quitosana ativada com glutaraldeído, e lactose pura. Letras iguais representam que não houve diferença estatística significativa entre os parâmetros avaliados em um nível de confiança de 5 % (letras minúsculas para enzima livre e letras maiúsculas para enzima imobilizada).



A partir da análise da Figura 17 fica ainda mais nítida a alta capacidade hidrolítica que a enzima possui, evidenciada pelos percentuais acima dos 90% em todos os casos estudados. Observa-se também que existe um leve favorecimento quando utilizada a enzima imobilizada, indicando que a imobilização otimizou o uso da enzima nas mesmas condições avaliadas. No entanto, os resultados obtidos da produção de lactulose mostram que o uso da enzima imobilizada desfavoreceu a produção de lactulose nas razões de 1:1, 1:2 e 2:1, apresentando um leve aumento de aproximadamente 4% e 11%, nas razões de 1:3 e 3:1, respectivamente. Uma das possíveis causas dessa redução pode ser devido a problemas conformacionais relacionados com ligação da enzima ao suporte, fazendo com que o sítio ativo fique menos disponível ao acesso pela molécula de substrato. Apesar do aumento da frutose no meio tender a favorecer a transgalactosilação, ainda é necessário que haja uma interação eficaz entre o galactosil e a enzima. Então, provavelmente, uma maior quantidade de substrato no meio poderia favorecer esse contato, como o observado na razão de 3:1. No entanto, apesar de promover uma maior interação entre a enzima e o substrato, isso não implica dizer que o processo será mais eficiente. Isso já foi comprovado ao analisar o rendimento na produção de lactulose por quantidade de lactose oferecida. Além disso, a possível formação de outros oligossacarídeos pode estar sendo favorecida, em detrimento da formação de lactulose, bem como a hidrólise desta. Vale lembrar também que  $\beta$ -galactosidases de *K. lactis* favorecem o processo hidrolítico, devido aos fatores mencionados anteriormente e às suas características genéticas específicas.

Hua e colaboradores (2013) avaliaram o efeito da concentração de frutose no meio na atividade de transgalactosilação de uma  $\beta$ -galactosidase de *K. lactis*. As concentrações de frutose avaliadas foram de 25, 50, 75, 100 e 125 g/L. Os autores observaram, com a produção de 1-lactulose e de lactulose, que as etapas de transgalactosilação tiveram uma otimização considerável com o aumento da concentração de frutose no meio até a concentração de 100 g/L, na qual obtiveram a maior quantidade de lactulose produzida (8,10 g/L). Além disso, os autores observaram que ocorreu uma preferência na produção da 1-lactulose em detrimento da produção de lactulose. De forma semelhante ao observado no presente estudo, os autores também observaram que ao longo da reação, ocorria uma redução na quantidade de lactulose presente no meio, sugerindo que uma hidrólise reversa ocorreu, quebrando a molécula de lactulose e liberando galactose e frutose no meio (HUA *et al.*, 2013). Além dessa hipótese, há também a possível formação de outros oligossacarídeos, como galactooligosacarídeos de cadeia dupla (GOS2), tripla

(GOS3) e até mesma quadrupla (GOS4) (OTIENO, 2010; RICO-RODRÍGUEZ *et al.*, 2018; RODRIGUEZ-COLINAS *et al.*, 2014).

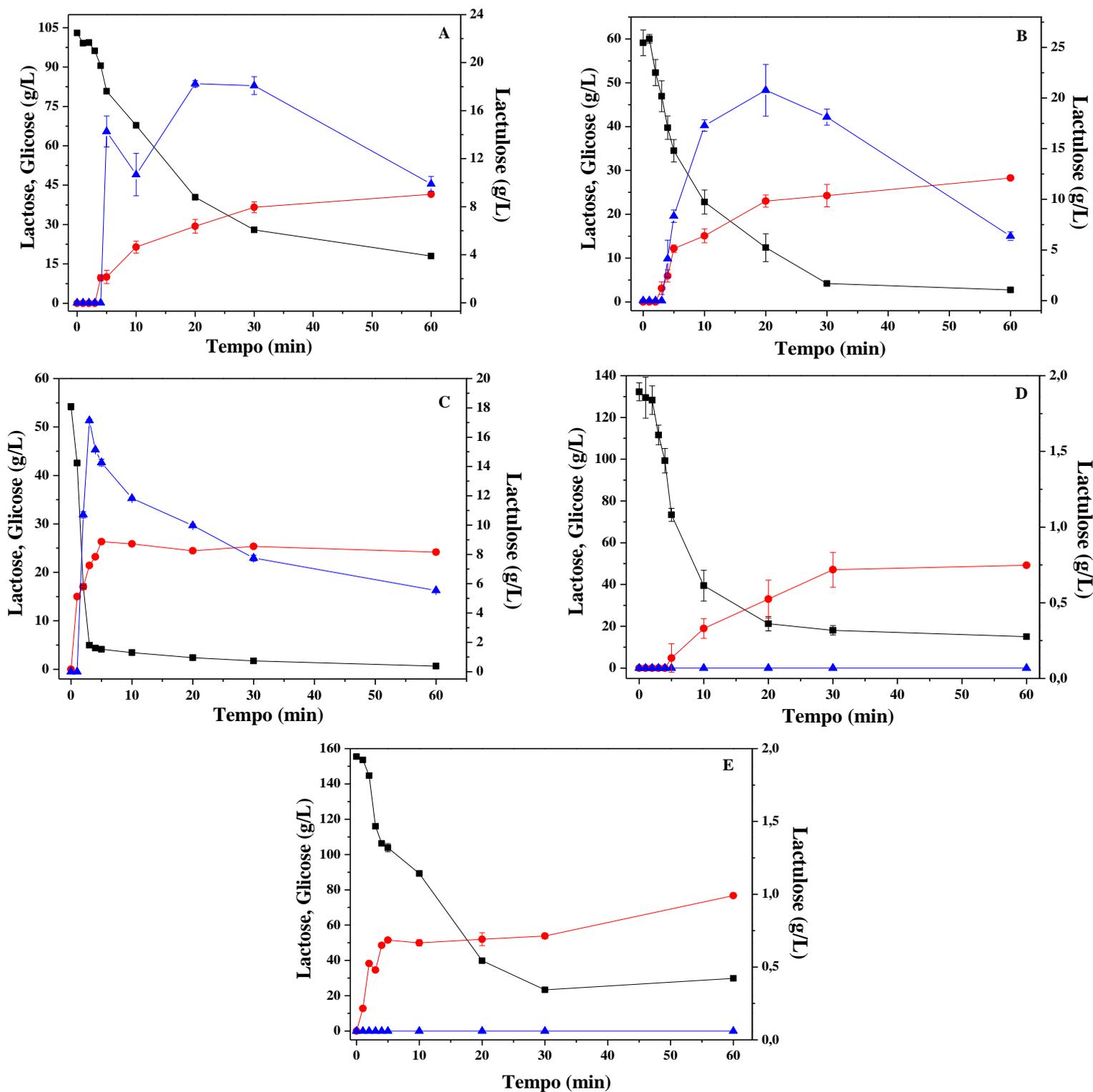
Um aumento na concentração de lactose, sem alteração na quantidade de frutose, também pode otimizar os resultados das reações de transgalactosilação. Os estudos conduzidos por Khatami e colaboradores (2014), no qual utilizaram uma  $\beta$ -galactosidase de *K. lactis* para produção de lactulose, mostraram que um aumento na concentração de lactose no meio, fixando-se a quantidade de frutose, também resultou em um aumento nos níveis de lactulose no meio. No entanto, isso não implica dizer que a taxa de produção de lactulose melhore com mais lactose presente no meio. Ou seja, fatores como produtividade e produção por grama de lactose oferecida tendem a diminuir com o aumento da lactose no meio. Os autores atribuiriam esse fator a duas características em particular: a primeira, já mencionada nesse estudo, é que a formação de outros oligossacarídeos, diferentes da lactulose, é intensificada. Sempre é importante destacar que o complexo galactosil-enzima, formado durante a reação de transgalactosilação, é bastante suscetível a reações com diferentes aceptores do galactosil, não se limitando apenas a frutose. A segunda característica está relacionada com o fato de que o aumento de lactose, além de saturar o meio com a própria lactose, causando uma precipitação espontânea, também dificulta a solubilidade de outras moléculas envolvidas na reação de transgalactosilação, como o caso da frutose (KHATAMI *et al.*, 2014). Esses fatores foram observados no presente estudo, sendo corroborados pelos resultados apresentados até então.

De posse desses resultados, a razão de 1:2 foi a escolhida como melhor razão nos estudos com reagentes puros. A seguir, serão apresentados os resultados dos estudos envolvendo o uso do soro de leite como substrato.

### **5.2.2 Estudos com soro de leite**

O intuito de se avaliar o processo de hidrólise da lactose e produção de lactulose utilizando soro de leite foi do possível uso de um subproduto comum nas indústrias de laticínios e com um alto potencial bioquímico, ser usado como uma fonte de matéria prima barata e abundante para o processo em questão. Dessa forma, buscou-se avaliar o processo, levando-se em conta as mesmas condições reacionais utilizadas nos estudos com reagentes puros, a fim de possibilitar-se um comparativo entre os dois substratos. A Figura 18 apresenta os resultados obtidos utilizando a enzima livre.

Figura 18 - Efeito da razão inicial de lactose:frutose no processo de hidrólise e produção de lactulose por  $\beta$ -galactosidase de *K. lactis* livre, utilizando soro de leite como substrato. Razão 1:1 (A); razão 1:2 (B); razão de 1:3 (C); razão de 2:1 (D) e razão de 3:1 (E). Condições reacionais: concentração total de substrato = 200 g/L ( $\pm 10$  g/L); tampão fosfato de potássio pH 7 e 50 mM; 50 °C e 120 RPM. Lactose (■), glicose (●) e lactulose (▲).



Fonte: O Autor (2021).

Um dos primeiros pontos a ser observado após a análise da Figura 18 é o fato de que não houve produção de lactulose em todas as razões avaliadas, mas apenas em algumas. Percebe-se que na razão de 2:1 e 3:1 não houve produção de lactulose em nenhum dos tempos avaliados, apesar de ter ocorrido a hidrólise, liberando glicose e galactose no meio. Provavelmente, a formação de outro tipo de oligossacarídeo pode estar sendo favorecida, em detrimento da produção de lactulose. Além disso, percebe-se também que a hidrólise ocorre de forma mais lenta, sendo perceptível pelo perfil do consumo de lactose apresentado nas Figuras 19.A, 19.B, 19.D e 19.E. Valor destoante dos casos anteriores, nos quais se obteve percentuais hidrolíticos acima dos 90 % em todas as razões avaliadas. Essa queda pode estar relacionada com a maior quantidade de massa de soro necessária para se atingir a concentração de lactose desejada para a razão em questão, ocorrendo uma saturação do soro no meio e, conseqüentemente, sua precipitação. A maior quantidade de soro está relacionada com o percentual de lactose disponível em sua composição, o qual é de aproximadamente 72,01% m/m. Com isso, menos lactose fica disponível no meio para a reação de hidrólise, já que parte da lactose presente na composição do soro de leite não será solubilizada, afetando também, de forma indireta, a produção de lactulose, já que dificulta a solubilização da frutose utilizada na sua formação (FATTAHI *et al.*, 2010; KHATAMI *et al.*, 2014).

Essa redução no potencial hidrolítico também é observada na razão de 1:1, já que nesse caso também se oferece uma maior quantidade de soro de leite, a fim de se atingir a concentração de lactose desejada. Nessa razão, também se obteve um percentual hidrolítico abaixo dos 90% (aproximadamente 83% da lactose oferecida foi hidrolisada). Além disso, a composição do soro de leite apresenta proteínas (como a  $\beta$ -lactoglobinas,  $\alpha$ -lactoglobinas, soroalbuminas e imunoglobina) que podem influenciar negativamente na atividade hidrolítica da enzima (DE ALBUQUERQUE *et al.*, 2018; LIMA *et al.*, 2013). Percebe-se também que houve uma influência significativa da concentração de frutose no meio, a qual favoreceu tanto a hidrólise quanto a transgalactosilação, como observado na razão de 1:3. Nesta razão, o percentual hidrolítico foi 98,79 %, sendo este valor um pouco mais elevado do que o percentual obtido nas mesmas condições e utilizando lactose pura.

Nesses estudos utilizando o soro de leite, destaca-se que as concentrações máximas de lactulose foram obtidas nas razões de 1:1, 1:2 e 1:3. Apesar de não se observar a produção na razão de 2:1 e 3:1, os resultados obtidos nas demais razões foram superiores aos resultados obtidos nos estudos com lactose pura. Na razão de 1:1, observou-se um aumento de 4,06% (18,24 g/L de lactulose), enquanto que na razão de 1:2, o aumento foi de

aproximadamente 25% (20,77 g/L de lactulose), seguido de um aumento de 24% na razão de 1:3 (17,13 g/L). Esses resultados mostram que apesar dos percentuais hidrolíticos se mostrarem inferiores quando em comparação, houve um favorecimento das reações de transgalactosilação. No entanto, salienta-se que os valores máximos de produção de lactulose foram obtidos em tempos maiores do que os observados nos estudos com reagentes puros, mostrando que compostos presentes no soro de leite interferiram na atividade catalítica. A seguir, a Tabela 10 apresenta os dados obtidos para cada razão avaliada no estudo com enzima livre e soro de leite como substrato.

Tabela 10 – Influência da variação na razão inicial de lactose:frutose na reação de hidrólise da lactose e produção de lactulose, utilizando soro de leite e  $\beta$ -galactosidase de *K. lactis* livre. Condições reacionais: concentração total de substrato = 200 g/L ( $\pm$  10 g/L); tampão fosfato de potássio 50 mM e pH 7,0; 7 U/mL, 50 °C e 120 RPM por 10 minutos. Letras iguais representam que não houve diferença estatística significativa entre os parâmetros avaliados em um nível de confiança de 5 %.

Razão La:Fru (m/m)	Hidrólise da lactose (%)	Produção máxima de lactulose (g/L)	$Y_{\text{lactulose}}$ (g lactulose/g lactose)	$Q_{\text{máx}}$ (g/L.min)
1:1	83,23 $\pm$ 1,43 <sup>a</sup>	18,24 $\pm$ 0,70 <sup>a</sup>	0,17 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>	0,92 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>
1:2	95,39 $\pm$ 2,49 <sup>a,c</sup>	20,77 $\pm$ 0,55 <sup>a</sup>	0,33 $\pm$ 0,09 <sup>b</sup>	1,20 $\pm$ 0,23 <sup>a</sup>
1:3	98,79 $\pm$ 1,51 <sup>b,c</sup>	17,13 $\pm$ 0,08 <sup>a</sup>	0,27 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>	0,86 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>
2:1	88,66 $\pm$ 4,13 <sup>a,d</sup>	0,00 $\pm$ 0,00 <sup>b</sup>	0,00 $\pm$ 0,00 <sup>c</sup>	0,00 $\pm$ 0,00 <sup>b</sup>
3:1	82,60 $\pm$ 0,17 <sup>a,c,d</sup>	0,00 $\pm$ 0,00 <sup>b</sup>	0,00 $\pm$ 0,00 <sup>c</sup>	0,00 $\pm$ 0,00 <sup>b</sup>

Fonte: O Autor (2021).

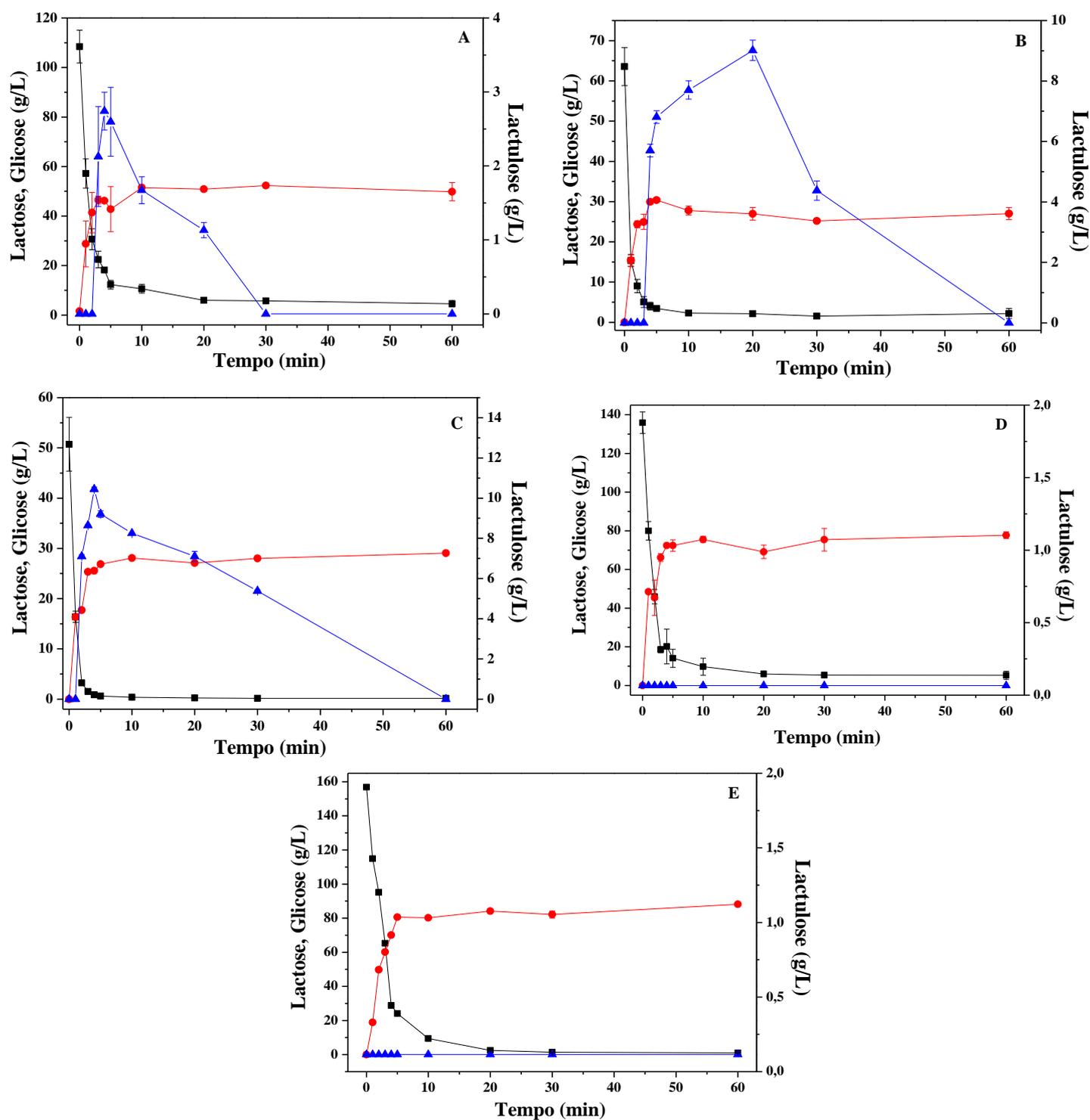
O comparativo entre os dados do estudo com lactose pura e soro de leite, ambos utilizando enzima livre, mostra que o rendimento na produção de lactulose por quantidade de lactose oferecida foi superior nas razões que apresentaram produção. Isso mostra que o uso do soro de leite favoreceu a reação de transgalactosilação, otimizando a produção de lactulose. No entanto, como mencionado anteriormente, percebe-se que os índices de

produtividade diminuíram, apesar das concentrações de lactulose superiores. Provavelmente, a enzima sofreu algum tipo de inibição inicial por proteínas presentes na composição do soro de leite, mas que, ao longo do processo, essa inibição é reduzida com a adaptação enzimática ao meio.

Outro fator que pode ter contribuído para redução no percentual hidrolítico e a não formação de lactulose em razões com maior quantidade de lactose, é o fato de que a enzima sofre inibição por parte da glicose liberada a partir da hidrólise da lactose (FONTES; PASSOS; PASSOS, 2001). Nas razões onde se observou queda no percentual hidrolítico para abaixo dos 90%, obteve-se concentrações finais de glicose de 41,53 g/L, 49,22 g/L e 76,75 g/L, para 1:1, 2:1 e 3:1, respectivamente. Nas demais razões (1:2 e 1:3), onde não se observou essa redução hidrolítica, as concentrações finais de glicose foram de 28,29 g/L e 24,19 g/L, respectivamente para as razões de 1:2 e 1:3. Isso mostra que os efeitos inibitórios podem começar a surgir a partir de 40 g/L de glicose presente no meio. Além da glicose, a quantidade de lactose residual presente no meio pode contribuir para uma redução na atividade enzimática (LIMA *et al.*, 2013; ORNELAS *et al.*, 2008). Observa-se que nas razões de 1:1, 2:1 e 3:1, a quantidade de lactose residual foi de 17,97 g/L, 15,01 g/L e 29,84 g/L, respectivamente. Isso corrobora com a hipótese acima e indica que concentrações residuais de lactose acima de 15 g/L podem ser prejudiciais ao processo como um todo.

Visando melhorar o rendimento do processo como um todo, também se avaliou o uso da enzima imobilizada em quitosana ativada com glutaraldeído. Os resultados obtidos estão expressos na Figura 19.

Figura 19 - Efeito da razão inicial lactose:frutose no processo de hidrólise e produção de lactulose por  $\beta$ -galactosidase de *K. lactis* imobilizada em quitosana ativada com glutaraldeído e utilizando soro de leite como substrato. Razão 1:1 (A); razão 1:2 (B); razão 1:3 (C); razão 2:1 (D) e razão 3:1 (E). Condições reacionais: concentração total de substrato = 200 g/L ( $\pm 10$  g/L); tampão fosfato de potássio pH 7 e 50 mM; 50 °C e 120 RPM. Lactose (■), glicose (●) e lactulose (▲).



Fonte: O Autor (2021).

Diferentemente das reações conduzidas com enzima livre, a imobilização enzimática promoveu uma melhora no processo, percebida através das baixas concentrações residuais de lactose ao término das reações (Figura 19). Além disso, percebe-se que houve uma inibição enzimática nas razões onde a concentração residual de glicose foi acima de 40 g/L, sendo que concentrações muito superiores a essa ocasionaram a não formação de lactulose. Nas razões onde se observou a formação de lactulose de forma mais significativa, a concentração de glicose residual foi de 27,03 g/L e 29,04 g/L, para 1:2 e 1:3, respectivamente. No entanto, é importante destacar que apenas a atividade de transgalactosilação sofreu inibição por parte desses fatores, sendo que a atividade hidrolítica não sofreu interferência. A seguir, a Tabela 11 apresenta os parâmetros obtidos para o estudo com soro de leite e  $\beta$ -galactosidase imobilizada em quitosana ativada com glutaraldeído.

Tabela 11 – Influência da variação na razão inicial de lactose:frutose na reação de hidrólise da lactose e produção de lactulose, utilizando soro de leite e  $\beta$ -galactosidase de *K. lactis* imobilizada em quitosana ativada com glutaraldeído. Condições reacionais: concentração total de substrato = 200 g/L ( $\pm$  10 g/L); tampão fosfato de potássio 50 mM e pH 7,0; 7 U/mL, 50 °C e 120 RPM por 10 minutos. Letras iguais representam que não houve diferença estatística significativa entre os parâmetros avaliados em um nível de confiança de 5 %.

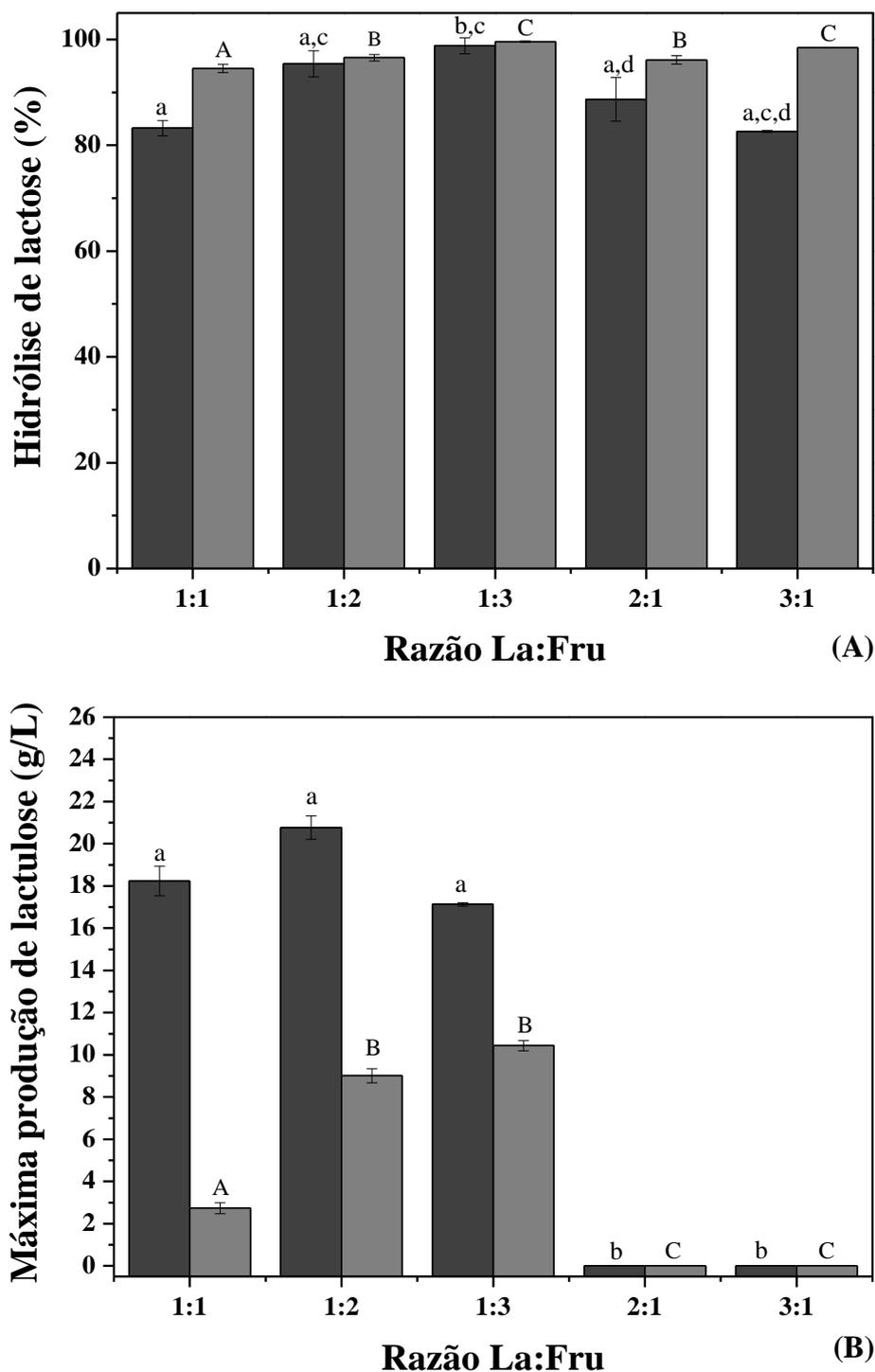
<b>Razão La:Fru (m/m)</b>	<b>Hidrólise da lactose (%)</b>	<b>Produção máxima de lactulose (g/L)</b>	<b><math>Y_{\text{lactulose}}</math> (g lactulose/g lactose)</b>	<b><math>q_{\text{máx}}</math> (g/L.min)</b>
1:1	94,51 $\pm$ 0,78 <sup>a</sup>	2,74 $\pm$ 0,26 <sup>a</sup>	0,03 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	0,68 $\pm$ 0,10 <sup>a</sup>
1:2	96,56 $\pm$ 0,61 <sup>b</sup>	9,01 $\pm$ 0,33 <sup>b</sup>	0,14 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>	0,45 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>
1:3	99,57 $\pm$ 0,11 <sup>c</sup>	10,44 $\pm$ 0,25 <sup>b</sup>	0,13 $\pm$ 0,02 <sup>b</sup>	2,61 $\pm$ 0,03 <sup>b</sup>
2:1	96,12 $\pm$ 0,80 <sup>b</sup>	0,00 $\pm$ 0,00 <sup>c</sup>	0,00 $\pm$ 0,00 <sup>c</sup>	0,00 $\pm$ 0,00 <sup>c</sup>
3:1	98,44 $\pm$ 0,05 <sup>c</sup>	0,00 $\pm$ 0,00 <sup>c</sup>	0,00 $\pm$ 0,00 <sup>c</sup>	0,00 $\pm$ 0,00 <sup>c</sup>

Fonte: O Autor (2021).

A análise da Tabela 11 permite perceber que, em termos de produção de lactulose, não houve uma melhora reacional significativa. O que se nota como promissor em relação aos ensaios com enzima livre, foi o fato de que na razão de 1:3 obteve-se a máxima concentração de lactulose num menor tempo, melhorando o parâmetro da produtividade. As concentrações de lactulose sofreram uma queda percentual de 84,97% (na razão de 1:1), de 56,62% (na razão de 1:2) e de 39,05% (na razão de 1:3). Os resultados obtidos corroboram com as hipóteses levantadas na discussão dos resultados obtidos nos estudos com lactose pura e enzima imobilizada. No entanto, o impacto negativo observado com o uso do soro de leite foi bem mais perceptível.

Song e colaboradores (2013) avaliaram a produção de lactulose utilizando  $\beta$ -galactosidase de *K. lactis* e soro de leite. Os autores obtiveram uma concentração máxima de lactulose de 3,54 g/L, utilizando uma solução de soro de leite com um percentual de 20% de lactose (valor máximo avaliado pelos autores). O percentual máximo de lactose presente nas soluções de soro de leite utilizadas pelos autores nas reações foi de 23%, valor bem inferior ao percentual de lactose presente nas soluções de soro de leite utilizadas no presente estudo (72,01%). Tal fato entra em conflito com o observado nos experimentos acima, pois neste estudo foi observado que a maior taxa de produção de lactulose foi obtida no maior percentual de lactose oferecida. De certo, os resultados obtidos por aqueles autores refletem o fato de que o meio utilizado para as reações propostas solubilizou bem os substratos presentes, favorecendo tanto processo hidrolítico, quanto as reações de transgalactosilação (SONG *et al.*, 2013b). No presente estudo, observou-se que altos níveis de substratos no meio reacional, dificultam a solubilização destes compostos, ocasionando redução da hidrólise e da formação de lactulose. A Figura 20 apresenta um comparativo entre os resultados obtidos nos estudos envolvendo o uso da enzima livre e da enzima imobilizada, ambos utilizando soro de leite como fonte de lactose.

Figura 20 – Comparativo entre os resultados obtidos no processo de hidrólise da lactose (A) e produção de lactulose (B) utilizando  $\beta$ -galactosidase de *K. lactis* livre (barra cinza escuro, ■) e imobilizada (barra cinza claro, ▒) em quitosana ativada com glutaraldeído, e soro de leite como fonte de lactose. Letras iguais representam que não houve diferença estatística significativa entre os parâmetros avaliados em um nível de confiança de 5 % (letras minúsculas para enzima livre e letras maiúsculas para enzima imobilizada).



Fonte: O Autor (2021).

É significativa a queda na produção de lactulose quando se utiliza a enzima imobilizada. Apesar da razão de 1:3 apresentar uma maior concentração de lactulose produzida, a razão de 1:2 apresentou um melhor rendimento de produção por grama de lactose oferecida. Um ponto importante a se destacar é que durante o processo de produção de lactulose, a hidrólise e transgalactosilação ocorrem de forma simultânea na reação. Ou seja, ao passo que a lactose vai sendo hidrolisada e os níveis de glicose e galactose no meio reacional aumentam, a galactose tende a reagir com a frutose já oferecida inicialmente para formação de lactulose, sendo essa reação catalisada pela própria  $\beta$ -galactosidase. Dessa forma, tende a existir um balanço entre essas duas reações, no qual a hidrólise da lactose passa a ocorrer de forma reduzida enquanto que a produção de lactulose passa a ser priorizada. A concentração inicial de lactose no meio é um dos principais fatores que influencia nesse balanço reacional, sendo o uso de altas concentrações de lactose limitado por sua solubilidade no meio, a qual vem a se tornar extremamente dependente da temperatura. No entanto, o uso de temperaturas acima dos 50 °C reduz significativamente a estabilidade enzimática, afetando negativamente tanto a hidrólise quanto a transgalactosilação (DE ALBUQUERQUE *et al.*, 2018; DE FREITAS *et al.*, 2020; LIMA *et al.*, 2013).

Vera e colaboradores (2012) observaram um comportamento semelhante ao observado na Figura 21, na qual observam-se altas taxas de hidrólise, no entanto com baixos índices de formação de lactulose. Tal fato pode ser explicado devido a uma maior energia de ativação necessária para reação de formação de lactulose (e outros galactooligossacarídeos), do que a energia necessária para hidrólise da lactose (VERA *et al.*, 2011, 2012). Além disso, esses autores também observaram que o comportamento de produção dos galactooligossacarídeos foi similar ao observado na produção de lactulose do presente estudo. Em condições de altas concentrações iniciais de lactose, observou-se que a formação de lactulose se dividiu em dois estágios: no primeiro, os autores observaram uma rápida formação de galactooligossacarídeos, seguida de um segundo estágio, no qual se observa uma redução na taxa de formação desses compostos, indicando que a reação passa a deixar de ser exclusivamente controlada pela cinética (GUERRERO; VERA; ACEVEDO; *et al.*, 2015; VERA *et al.*, 2012).

Fischer & Kleinschmidt (2015) avaliaram a síntese de galactooligossacarídeos utilizando o soro de leite doce e ácido como substrato para as reações. Os estudos foram feitos comparando-se  $\beta$ -galactosidases de *A. oryzae* e de *K. lactis*. O comportamento

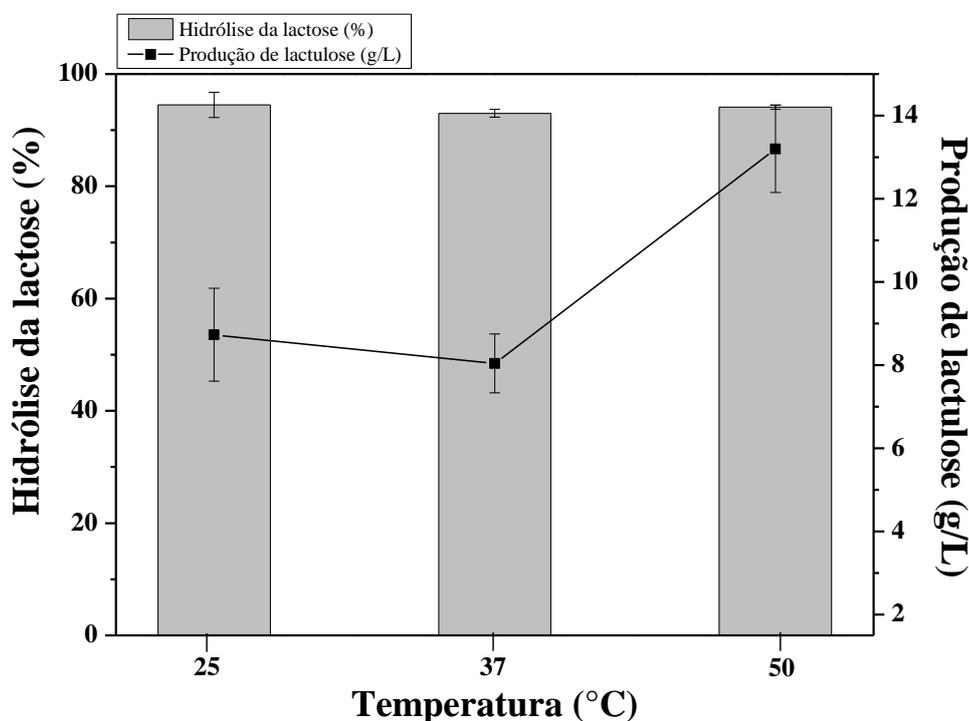
observado pelos autores foi similar para as duas enzimas avaliadas. Para a enzima oriunda de *A. oryzae*, observou-se que pouco ou nenhum efeito inibitório por parte de algum componente presente na composição do soro de leite, seja ele ácido ou doce. No caso do processo com a enzima proveniente de *K. lactis*, mesmo com o aumento da concentração de soro, o que ocasionou aumento dos níveis de possíveis compostos inibidores, a redução na atividade enzimática foi menor do que a esperada, resultando em ótimos índices de hidrólise de lactose e numa boa quantidade de galactooligossacarídeos formada ao término das reações (FISCHER; KLEINSCHMIDT, 2015). Um outro ponto a se observar é que durante o processo de hidrólise da lactose, duas etapas podem ser verificadas: a primeira, é a formação do complexo enzima-galactosil e a liberação de glicose no meio; a segunda etapa, consiste na transferência do galactosil do complexo enzimático para algum acceptor que contenha um grupamento hidroxil em sua estrutura. Sabendo disso, percebe-se que em situações nas quais a concentração de lactose no meio é baixa, a própria lactose passa a ser mais competitiva para atuar como agente acceptor, formando galactose e a liberando do sítio ativo da enzima para o meio. Já em situações em que a concentração de lactose no meio é mais alta, esse carboidrato também pode se tornar um agente acceptor, sendo nesse caso, ligada ao complexo galactosil-enzima. Ou seja, à baixa concentração de lactose, esta torna-se mais competitiva pelo sítio ativo enzimático, podendo se ligar a esse sítio ao invés da galactose. Em situações com altas concentrações de lactose, pode ocorrer a ligação da lactose ao complexo enzima-galactosil formado, gerando outros tipos de oligossacarídeos (ZHOU; CHEN, 2001). Isso mostra o quão importante é identificar um patamar de concentração ideal de lactose no meio, que não atrapalhe o processo hidrolítico nem a formação de lactulose.

A partir da análise dos resultados obtidos a partir da análise da influência das razões de substrato no meio reacional, optou-se pelo o uso da razão de 1:2, já que na maioria dos parâmetros avaliados nesse estudo não houve diferenças significativas em relação à razão de 1:3, a qual também apresentou resultados satisfatórios. Além disso, espera-se, com essa opção, reduzir a quantidade de frutose utilizada, viabilizando economicamente o processo proposto, já que o soro de leite é obtido em quantidades altas e a baixos valores, diferentemente da frutose, a qual foi adquirida na forma de reagente puro, encarecendo o processo. Assim, investigou-se a influência da temperatura no processo, a fim de se identificar possíveis efeitos térmicos na estabilidade operacional do biocatalisador.

### 5.3 Influência da temperatura no processo de hidrólise da lactose e produção de lactulose

Entender a influência da temperatura em processos reacionais sempre foi um ponto importante em estudos envolvendo processos bioquímicos. Os estudos desenvolvidos nesse tópico buscam investigar o desempenho do biocatalisador quando submetido a temperaturas inferiores à sua temperatura de operação. Além disso, buscou-se avaliar os efeitos de uma incubação do biocatalisador à temperatura ótima de reação e, em seguida, sua aplicação em reações nas mesmas temperaturas inferiores à temperatura ótima de operação. A Figura 21 mostra a influência da temperatura no processo de hidrólise da lactose e síntese de lactulose.

Figura 21 –Influência da temperatura no processo de hidrólise da lactose e síntese de lactulose por  $\beta$ -galactosidase de *K. lactis* imobilizada em quitosana ativada com glutaraldeído. Condições reacionais: concentração total de substrato = 200 g/L ( $\pm$  10 g/L); tampão fosfato de potássio 50 mM e pH 7,0; 7 U/mL e 120 RPM por 20 minutos.



Fonte: O Autor (2021).

A temperatura exerceu uma influência direta sobre a atividade enzimática e, consequentemente, sobre o processo como um todo (Figura 21). A temperatura exerceu uma

maior influência sobre o processo de transgalactosilação do que no processo de hidrólise, o qual manteve os percentuais acima de 90% nas três temperaturas avaliadas. O estudo feito por Vera e colaboradores (2011) mostrou que a atividade de transgalactosilação de uma  $\beta$ -galactosidase de *A. oryzae* aumenta quando se utiliza temperaturas que variem da faixa de 40 a 55 °C (VERA; GUERRERO; ILLANES, 2011). Esse comportamento foi semelhante ao observado na Figura 19, onde observa-se um aumento na produção de lactulose de aproximadamente 68%, da temperatura de 37 °C para a de 50 °C. Em temperaturas superiores a 55 °C ocorre a redução da atividade enzimática, mas em decorrência da desnaturação da enzima (ILLANES; VERA; WILSON, 2016; NETO *et al.*, 2021; XAVIER; RAMANA; SHARMA, 2018).

O processo hidrolítico da lactose por  $\beta$ -galactosidases, utiliza a água como nucleófilo para o galactosil liberado no meio. Esse processo é favorecido logo no início, devido as altas concentrações de lactose ainda presentes no meio. Ao passo que a lactose vai sendo hidrolisada, as concentrações de galactose e glicose vão aumentando, fazendo com que a lactose, antes em maior quantidade, passe a competir como nucleófilo pela porção de galactosil gerada. Dessa forma, a formação de galactooligossacarídeos pode ocorrer. Esse tipo de competição nucleofílica afeta significativamente o balanço reacional entre hidrólise e transgalactosilação, sendo a temperatura um dos parâmetros influenciadores dessa competição (ALBUQUERQUE, 2018). Mas não devido a alterações causadas na enzima devido as variações térmicas e sim devido ao surgimento de possíveis problemas difusionais ocasionados pela alteração da solubilidade (parâmetro com forte dependência dos substratos no meio).

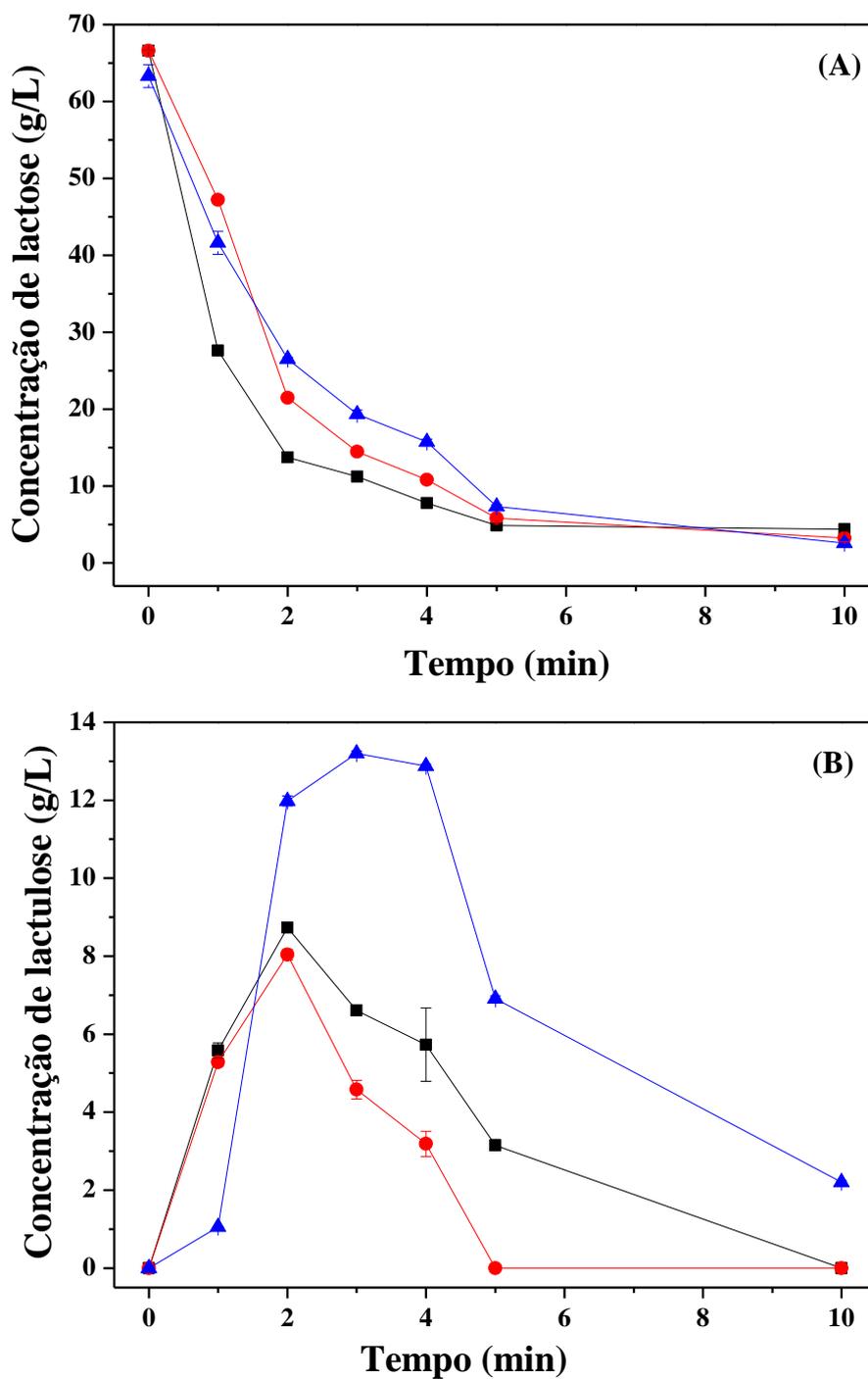
Aburto e colaboradores (2020) avaliaram o desempenho de uma  $\beta$ -galactosidase produzida a partir de uma cepa de *Bacillus circulans* investigando diferentes temperaturas (variando de 30 °C a 60 °C). Os autores observaram um comportamento semelhante ao obtido no presente estudo, em relação à eficiência hidrolítica da enzima, a qual apresentou índices satisfatórios. Já em relação ao comportamento de transgalactosilação enzimática, esses autores observaram que com o aumento da temperatura a seletividade da reação pela etapa de transgalactosilação apresentou um comportamento praticamente constante, com pequenas oscilações entre os níveis de temperatura avaliados (ABURTO *et al.*, 2020). Apesar de serem oriundas de cepas diferentes, as  $\beta$ -galactosidases apresentam um comportamento semelhante quando avaliadas sobre um contexto térmico, diferindo apenas

nas quantidades e nos rendimentos de produção dos oligossacarídeos relacionados aos estudos.

Guerrero e colaboradores (2011) avaliaram a influência das condições reacionais na seletividade enzimática de  $\beta$ -galactosidases de diferentes cepas. Ao se investigar o efeito da temperatura, os autores observaram que a conversão de lactose praticamente foi a mesma em todas as temperaturas avaliadas (40, 45, 50, 55 e 60 °C). Já no caso do rendimento de produção de lactulose e de galactooligossacarídeos, houve uma influência significativa da temperatura nesses parâmetros, indicando um comportamento semelhante ao observado no presente estudo. Porém, os autores observaram que a 60 °C a  $\beta$ -galactosidase proveniente de uma cepa de *A. oryzae* ainda apresentou uma atividade residual, o que não é esperado, considerando que a enzima não possui uma boa estabilidade térmica nessa temperatura, sendo praticamente desnaturada sob essa condição térmica. Contudo, os autores associaram o ocorrido ao fato de que  $\beta$ -galactosidases e outras glicosidases podem ter sua estabilidade melhorada em situações reacionais, devido à presença de açúcares que podem atuar como estabilizadores (GUERRERO *et al.*, 2011).

A seguir, a Figura 22 apresenta um comparativo entre as temperaturas estudadas, mostrando a influência delas nos perfis de conversão de lactose e de síntese de lactulose com o tempo.

Figura 22 – Perfis de concentração de lactose (A) e de lactulose (B) com a variação da temperatura: 25 °C (■); 37 °C (●) e 50 °C (▲). Condições reacionais: concentração total de substrato = 200 g/L ( $\pm$  10 g/L); tampão fosfato de potássio 50 mM e pH 7,0; 7 U/mL e 120 RPM por 10 min.



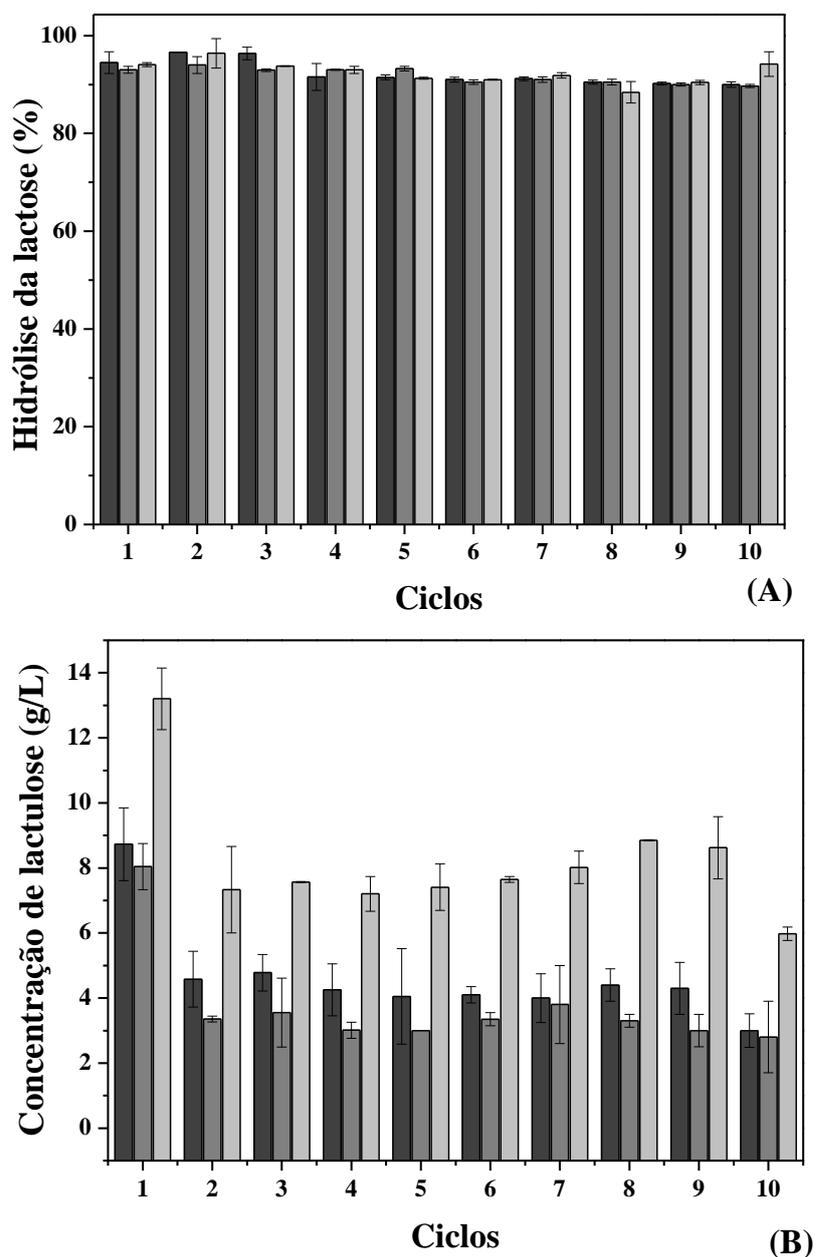
Fonte: O Autor (2021).

A baixas temperaturas, o processo de hidrólise se mostrou um pouco mais rápido do que a temperaturas superiores (Figura 22.A), já que em tempos menores a quantidade de lactose residual no meio reacional foi menor na temperatura de 25 °C. No entanto, essa característica não chega a ser um fator crucial no processo hidrolítico, já que ao término da reação, praticamente toda lactose presente no meio foi convertida, mostrando que de fato não existe uma influência significativa da temperatura no processo de hidrólise para as temperaturas analisadas. No entanto, o efeito da temperatura na atividade de transgalactosilação foi mais perceptível (Figura 22.B), ocorrendo um pico, após 3 min de reação, na concentração de lactulose na temperatura de 50 °C. Nas demais temperaturas, a máxima concentração ocorreu na faixa dos 2 min de reação, sendo um pouco maior na temperatura de 25 °C. Ademais, um outro ponto importante é que nas temperaturas inferiores a concentração de lactulose atingiu concentração zero ao término da reação, enquanto que na temperatura mais elevada ainda foi constatado uma quantidade de lactulose residual, indicando que temperaturas superiores não favorecem a hidrólise reversa da lactulose, como o observado nas outras temperaturas ou a síntese de outros oligossacarídeos.

### ***5.3.1 Avaliação da estabilidade operacional do biocatalisador em diferentes temperaturas***

De posse dos resultados obtidos do estudo da temperatura, partiu-se para uma investigação acerca da estabilidade operacional do biocatalisador obtido e os efeitos da temperatura sobre tal parâmetro. A Figura 23 apresenta os resultados obtidos de hidrólise e produção de lactulose durante o estudo da estabilidade operacional do biocatalisador em diferentes temperaturas.

Figura 23 – Estabilidade operacional da  $\beta$ -galactosidase de *K. lactis* imobilizada em quitosana ativada com glutaraldeído. Temperaturas avaliadas: 25 °C (■), 37 °C (■) e 50 °C (■). Percentuais de hidrólise de lactose (A) e concentração máxima de lactulose (B), obtidos por ciclo. Condições reacionais: concentração total de substrato = 200 g/L ( $\pm$  10 g/L); tampão fosfato de potássio 50 mM e pH 7,0; 7 U/mL e 120 RPM por 10 minutos.



Fonte: O Autor (2021).

A avaliação da Figura 23 confirma o relatado anteriormente, de que a variação da temperatura, dentro do faixa avaliada, não exerce influência significativa sobre a atividade hidrolítica do biocatalisador, além de não influenciar em sua estabilidade

operacional, já que ao término de 10 ciclos reacionais o percentual hidrolítico se manteve constante, na faixa de 90%. Isso comprova que  $\beta$ -galactosidases de *K. lactis* possuem uma tendência a favorecer a hidrólise, sem contar com o fato de que não necessariamente os parâmetros ótimos para a reação de hidrólise sejam os mesmos para a reação de transgalactosilação (DE ANDRADE *et al.*, 2020; ZOLNERE; CIPROVICA, 2017). Dessa forma, pode-se afirmar que o balanço entre as reações de hidrólise e de transgalactosilação sofre influência da temperatura. Contudo, as alterações nas concentrações do agente doador do galactosil que influenciam de fato a etapa de transgalactosilação (GUERRERO; VERA; CONEJEROS; *et al.*, 2015), já que a afinidade que a enzima tem pelos agentes doadores (e, nesse caso, a lactose) e pelos nucleófilos (nesse caso, a frutose), dependerá da cepa de origem e não de alterações na temperatura (SPOHNER *et al.*, 2016; ZHU, Fan *et al.*, 2018).

Avaliando a Figura 23.B, nota-se uma queda significativa na produção de lactulose ao longo dos ciclos. Na temperatura de 25 °C, observou-se que houve um decréscimo acentuado na concentração de lactulose a partir do segundo ciclo, a qual reduziu-se de 8,73 g/L para 4,57 g/L, e manteve-se nesse valor, com poucas variações, até o décimo ciclo. O mesmo comportamento foi observado na temperatura de 37 °C, na qual observou-se uma redução de 8,04 g/L para 3,54 g/L, notando-se pequenas oscilações do segundo até o décimo ciclo. Apesar da queda observada nas três temperaturas avaliadas ao longo dos ciclos, nota-se que a variação de concentração entre os ciclos (a partir do segundo) não é tão intensa, ao ponto de poder se deduzir que houve um decréscimo na atividade de transferase da enzima. Provavelmente, entre o primeiro e o segundo ciclo, ocorreu a perda de algumas subunidades da enzima que não estavam totalmente fixadas ao suporte. Por se tratar de uma enzima multimérica, muitas vezes a perda de subunidades pode acarretar na redução da eficiência catalítica da enzima, ocasionado o observado na figura acima (FERNANDEZ-LAFUENTE, 2009)

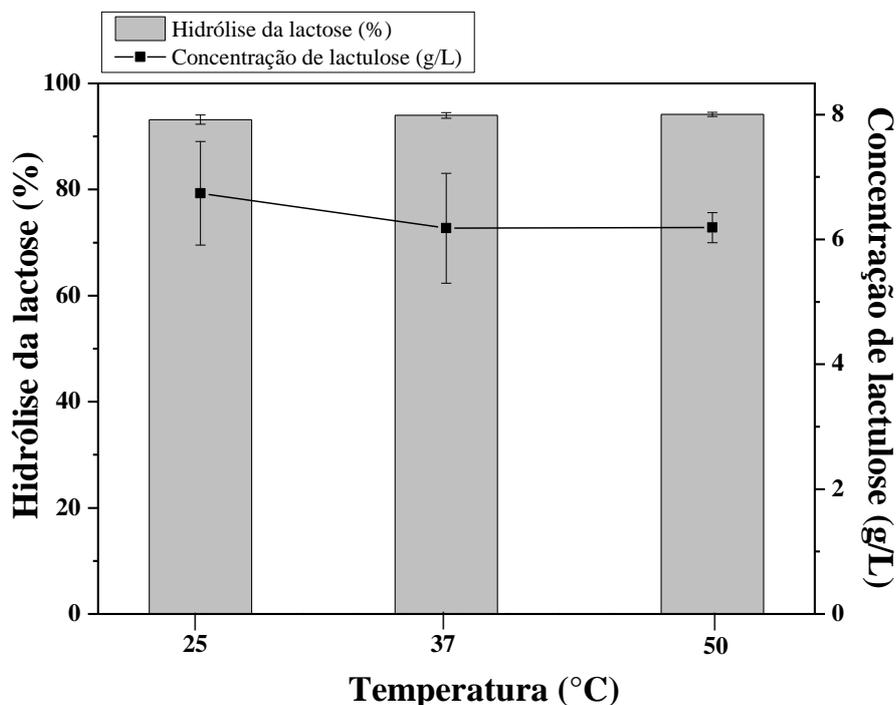
Estudos conduzidos por Guerrero e colaboradores (2017) avaliaram a estabilidade operacional de uma  $\beta$ -galactosidase de *A. oryzae* imobilizada em diferentes matrizes de agarose. Os autores avaliaram a formação de lactulose e outros oligossacarídeos através de 10 ciclos sucessivos. O observado por eles foi semelhante ao observado no presente estudo, no entanto, do primeiro para o segundo ciclo não ocorreu um decréscimo na quantidade de lactulose produzida, como o observado neste estudo. Ao longo dos ciclos houve uma constância nos valores observados, com pequenas oscilações ao longo de cada ciclo avaliado (GUERRERO; VERA; ILLANES, 2017b).

De posse desses resultados, foram avaliados processos de incubação prévia do biocatalisador à temperatura ótima de reação, e seu uso logo após a temperaturas inferiores, buscando-se observar se esta incubação prévia altera alguma conformação enzimática, fazendo com que o sítio ativo da enzima se torne mais exposto aos substratos envolvidos nas reações.

### ***5.3.2 Avaliação da estabilidade operacional do biocatalisador após o processo de incubação a 50 °C e com reações ocorrendo em diferentes temperaturas***

Com os resultados até então obtidos e analisados, observou-se que a temperatura utilizada não ocasionou grandes mudanças na eficiência hidrolítica do processo, mas ocasionou alterações no processo de transgalactosilação, evidenciando que uma temperatura ótima do processo está na faixa dos 50 °C. Dessa forma, optou-se por investigar uma possível otimização das propriedades do biocatalisador, após uma prévia incubação na temperatura ótima da reação em tampão fosfato de potássio pH 7,0 e 50 mM. A Figura 24 apresenta os resultados obtidos nesse estudo.

Figura 24 – Influência da temperatura no processo de hidrólise da lactose e formação de lactulose por  $\beta$ -galactosidase de *K. lactis* imobilizada em quitosana ativada com glutaraldeído, após incubação prévia a 50 °C por 10 min. Condições reacionais: concentração total de substrato = 200 g/L ( $\pm$  10 g/L); tampão fosfato de potássio 50 mM e pH 7,0; 7 U/mL e 120 RPM por 10 minutos.



Fonte: O Autor (2021).

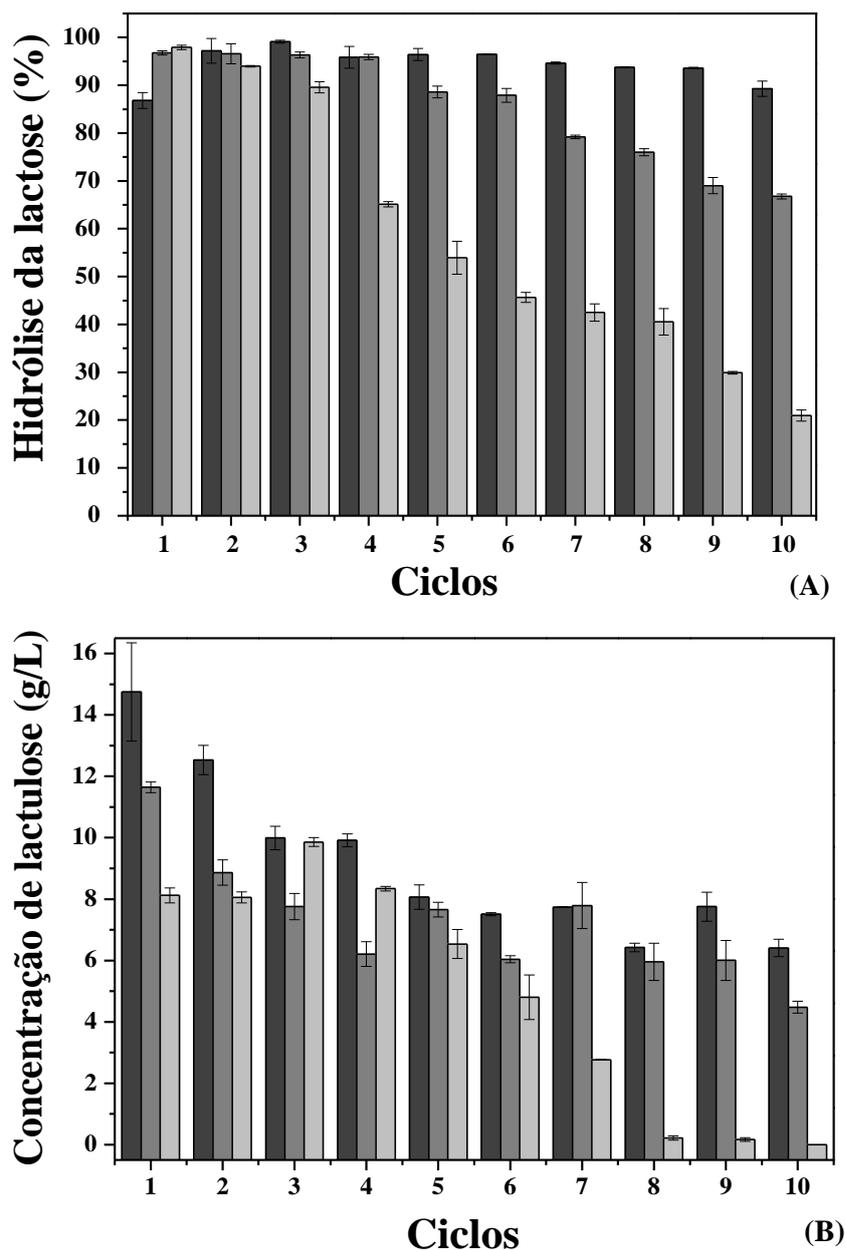
Após o processo de incubação prévia a 50 °C, os níveis de hidrólise da lactose foram próximos aos obtidos sem nenhum procedimento prévio, ou seja, não houve alterações significativas em relação aos percentuais hidrolíticos, obtendo percentuais de 93,16 % (25 °C), 93,18 % (37 °C) e 94,18 % (50 °C). No entanto, a incubação influenciou negativamente a etapa de transgalactosilação, reduzindo as concentrações obtidas em todas as temperaturas avaliadas (ver Figuras 20 e 24). Para a temperatura de 25 °C a redução foi de aproximadamente 24 %, seguida de uma redução de 22,88 %, para a temperatura de 37 °C e, por fim, a maior redução observada, para a temperatura de 50 °C, sendo de 53,03 %.

Provavelmente, a queda na taxa de formação de lactulose para a temperatura de 50 °C está relacionada ao fato de que a  $\beta$ -galactosidase tende a favorecer a hidrólise reversa da lactulose formada, já que a enzima também possui afinidade pela própria lactulose (FISCHER; KLEINSCHMIDT, 2018). As possíveis alterações conformacionais ocasionadas pela incubação a 50 °C podem ter contribuído para o aumento da especificidade

da enzima pelos substratos presentes no meio (além da frutose), promovendo a formação de complexos em estado de transição mais estáveis, otimizando as reações de transgalactosilação (PEREIRA-RODRÍGUEZ *et al.*, 2012; RODRÍGUEZ *et al.*, 2008). Os aminoácidos residuais presentes no sítio ativo da enzima é que determinam a estabilidade desses compostos de transição e variam com a fonte da enzima, em geral. No entanto, o processo incubatório pode ter alterado a disposição desses resíduos aminoácidos, fazendo com que a enzima aumentasse sua afinidade por outros aceptores do galactosil, favorecendo, possivelmente, o processo de transgalactosilação para formação de outros oligossacarídeos (KACZYŃSKI; CAIS-SOKOLIŃSKA; SZWENGIEL, 2019).

Após análise dos resultados obtidos, realizou-se uma avaliação da estabilidade operacional dos biocatalisadores obtidos nas referidas temperaturas, a fim de observar se durante os ciclos ocorreria um comportamento semelhante ao observado no processo sem a incubação e os resultados estão apresentados na Figura 25.

Figura 25 – Estabilidade operacional da  $\beta$ -galactosidase de *K. lactis* imobilizada em quitosana ativada com glutaraldeído, após o processo de incubação a 50 °C por 10 minutos. Temperaturas avaliadas: 25 °C (■), 37 °C (▒) e 50 °C (░). Percentuais de hidrólise de lactose (A) e concentração máxima de lactulose (B), obtidos por ciclo. Condições reacionais: concentração total de substrato = 200 g/L ( $\pm$  10 g/L); tampão fosfato de potássio 50 mM e pH 7,0; 7 U/mL e 120 RPM por 10 minutos.



Fonte: O Autor (2021).

A partir do terceiro ciclo, o percentual hidrolítico à temperatura de 50 °C começa a diminuir, chegando até o percentual de 20% no último ciclo avaliado (Figura 25.A),

ocorrendo uma perda da eficiência catalítica de 78,6% ao longo dos reciclos, refletida também na diminuição da formação de lactulose (Figura 25.B). Muito provavelmente, o motivo desse comportamento não esteja diretamente relacionado à temperatura em si, mas sim a problemas operacionais durante os reciclos, como variações na temperatura e no pH. Até mesmo, essa redução catalítica pode estar associada ao tempo de meia vida da enzima na temperatura de 50 °C, o qual é de aproximadamente de 47 min (Neto, 2020). Como o tempo total dos ciclos foi de aproximadamente 100 min, é esperado que ocorra esse decréscimo no percentual de hidrólise na formação de lactulose na temperatura de 50 °C ao longo dos reciclos. Já ao se analisar as temperaturas de 25 °C e 37 °C, observa-se que os percentuais de hidrólise permanecem mais elevados, sendo que a partir do sétimo ciclo é que se observa uma redução mais acentuada nesse percentual, que cai em aproximadamente 18 %, alcançando a uma redução total de 31 % ao término dos 10 ciclos.

Na temperatura de 25 °C foi observada a menor perda de eficiência hidrolítica em comparação com o processo sem incubação, apresentando uma redução de aproximadamente 8% ao término dos reciclos. Do ponto de vista da formação de lactulose observa-se que a redução nos percentuais de hidrólise refletiu diretamente nas taxas de formação de lactulose, já que com menos galactose presente no meio, menos lactulose seria produzida pela enzima. Percebe-se aqui a relação existente entre a hidrólise e a transgalactosilação, na qual uma depende da outra, devendo haver um balanço entre ambas. Por mais que a temperatura de 25 °C não favoreça a atividade de transferase, com mais substratos disponíveis no meio, oriundos dos altos percentuais de hidrólise ao longo dos reciclos, então, conseqüentemente, as taxas de reação de transgalactosilação serão maiores, em comparação as outras temperaturas.

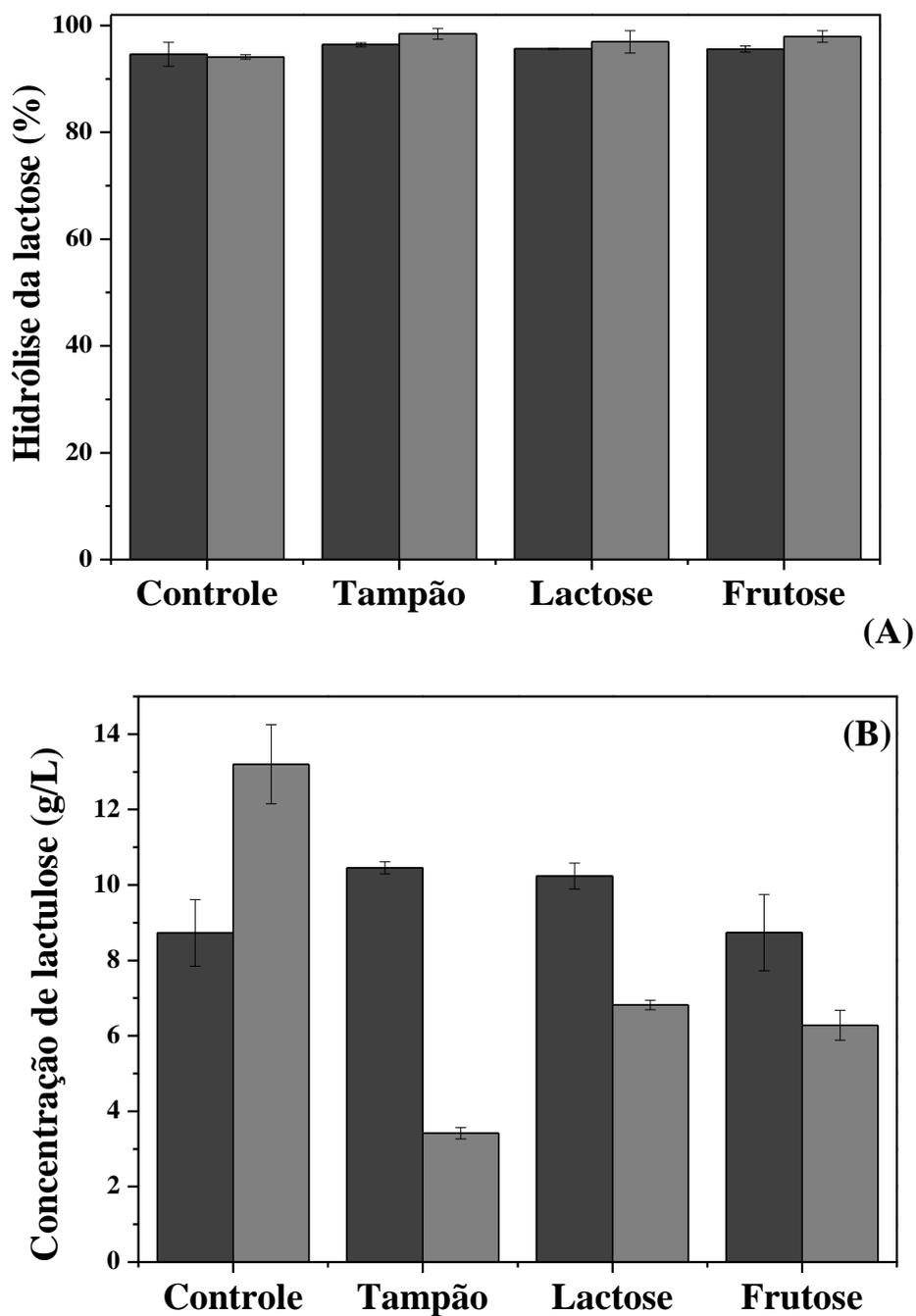
Boon e colaboradores (2000) avaliaram o efeito que a temperatura tinha sobre a síntese enzimática de oligossacarídeos, utilizando  $\beta$ -galactosidases de diversas fontes. As faixas avaliadas variaram de 20 °C a 65 °C. Em conjunto com a avaliação térmica, os autores também realizaram uma avaliação do percentual inicial de lactose no meio, a fim de se determinar se o qualquer efeito ocasionado na reação era devido a mudanças na temperatura ou a alterações nas concentrações iniciais de lactose. Os autores concluíram que de fato existe uma influência da temperatura sobre o processo de formação de oligossacarídeos, mas que a influência exercida pela concentração inicial de substrato se sobrepõe a aquela, mostrando que, de fato, esse tipo de reação é controlada cineticamente, assim como o observado neste estudo (BOON; JANSSEN; VAN 'T RIET, 2000). O que de fato pode

acontecer com o aumento da temperatura é a ocorrência de uma desnaturação enzimática, ou alterações na solubilidade dos substratos necessários para a reação.

#### **5.4 Influência do meio reacional no processo de hidrólise da lactose e na produção de lactulose**

Prosseguindo nas avaliações das melhores condições operacionais, investigou-se os efeitos que processos de incubação nos substratos podem ter no desempenho do biocatalisador. As incubações foram feitas no próprio tampão (fosfato de potássio pH 7,0 e 50 mM), em uma solução de lactose (66,7 g/L) e em uma solução de frutose (133,3 g/L) e os resultados obtidos estão expressos na Figura 26. O resultado que indica o estudo de controle foi feito sem incubação prévia.

Figura 26 – Efeito da incubação do biocatalisador a 50 °C por 30 minutos em tampão fosfato de potássio (50 mM e pH 7,0), lactose (66,7 g/L) e frutose (133,3 g/L) na hidrólise da lactose (A) e produção de lactulose (B) por  $\beta$ -galactosidase de *K. lactis* immobilizada em quitosana ativada com glutaraldeído, a 25 °C (barra cinza escuro, ■) e 50 °C (barra cinza claro, ▨). Condições reacionais: concentração total de substrato = 200 g/L ( $\pm$  10 g/L); tampão fosfato de potássio 50 mM e pH 7,0; 7 U/mL e 120 RPM por 10 minutos.



Fonte: O Autor (2021).

A Figura 26.A apresenta os resultados de hidrólise obtidos a 25 e 50 °C. Percebe-se uma discreta vantagem na temperatura de 50 °C, como obtido nos resultados do estudo da influência da temperatura. Além disso, o processo de incubação prévia também não resultou em alterações significativas nos percentuais de hidrólise, mantendo-se inalterada a eficiência hidrolítica do biocatalisador. No entanto, de forma semelhante aos resultados obtidos no estudo da incubação térmica, ocorreu uma melhora na concentração de lactulose máxima produzida a 25 °C, principalmente quando ocorreu a incubação em tampão e lactose, gerando um aumento de 16,55 % e 14,76 %, respectivamente. A incubação prévia em tampão, possivelmente auxilia no processo de interação entre grupos funcionais específicos presentes na superfície enzimática devido ao pH utilizado no meio reacional, já que a  $\beta$ -galactosidase atua melhor em meios com o pH neutro, tanto na hidrólise quanto na transgalactosilação. Já a incubação prévia nos substratos permite que o biocatalisador tenha uma espécie de contato prévio com os grupos funcionais participantes das reações, fazendo com que a enzima possivelmente interaja de maneira mais eficaz com os substratos (AIDER; HALLEUX, 2007; GUERRERO; VERA; CONEJEROS; *et al.*, 2015; SCHMIDT *et al.*, 2020; VERA; GUERRERO; ILLANES, 2011). Já na análise da quantidade de lactulose formada, nota-se que a incubação em tampão não foi benéfica para o processo na temperatura de 50 °C, já que se observou uma redução de quase 75% na produção de lactulose. Nos estudos com lactose ou frutose, ambos a 50 °C, também se observou que houve uma redução na quantidade de lactulose, a qual caiu 48 % e 52 %, respectivamente. As melhorias nesse parâmetro foram observadas na temperatura de 25 °C, nas incubações feitas em tampão e em lactose. Talvez a piora observada no estudo a 50 °C com incubação em tampão se deva ao fato de que nessa temperatura, a enzima provavelmente tenha entrado num estado de ativação, mas a ausência de substrato no meio deva ter ocasionado uma redução na atividade de transferase, sem alterações na atividade hidrolítica. É muito provável que após durante o processo de hidrólise, o complexo galactosil-enzima tenha tido mais afinidade por um nucleófilo diferente da frutose, como a glicose liberada, ou a própria lactose residual ou até mesmo a água (ILLANES; VERA; WILSON, 2016).

Em relação a melhora na produção de lactulose observada na temperatura de 25 °C, provavelmente a enzima tenha entrado num estado de latência durante o processo de incubação, fazendo com que o biocatalisador fosse mais eficiente ao entrar em uma condição reacional mais favorável à hidrólise e à produção de lactulose. Já a melhora observada após a adaptação em lactose, é provável que tenha relação com a alta especificidade da enzima

com a galactose presente na composição da lactose. Essa especificidade depende dos grupamentos hidroxila presentes, especificamente, nas posições 2, 3 e 4 da molécula de lactose. Estando na conformação correta, esses grupos funcionais otimizam o processo de hidrólise e de transgalactosilação (HANEFELD; GARDOSI; MAGNER, 2009; RUEDA *et al.*, 2016; SOUZA; GARCIA-ROJAS; FAVARO-TRINDADE, 2018). Uma adequação conformacional da estrutura enzimática ao substrato pode ter ocorrido durante o processo de incubação da enzima em lactose, facilitando e otimizando o processo quando este ocorreu nas condições reacionais utilizadas. No entanto, vale lembrar que  $\beta$ -galactosidases também têm a capacidade de realizar hidrólises reversas, reduzindo a quantidade de lactulose formada no meio, como o observado na temperatura de 50 °C. Em geral, a hidrólise reversa é favorecida quando se tem um alto percentual de substratos que possuam esses grupos funcionais em orientações diferentes das observadas na galactose, como é o caso da própria glicose, a qual, em geral, possui uma orientação diferente na hidroxila presente na posição 3, em relação a galactose. Isso faz com que a especificidade enzimática mude, favorecendo assim a reações reversas (JUERS, D. H. *et al.*, 2001; JUERS; MATTHEWS; HUBER, 2012).

Em relação ao processo de incubação em solução de frutose, percebeu-se que não houve contribuições relevantes para o processo a 25 °C, tendo a concentração de lactulose se mantido a mesma, praticamente. No processo a 50 °C percebe-se que houve uma redução significativa, comparando-se ao controle, mas com valores aproximados, quando comparada à incubação em lactose. Apesar de se tratar de uma pentose, a frutose possui grupamentos hidroxilas em posições semelhantes às observadas na galactose, o que pode ter contribuído para esse resultado similar entre os dois estudos. A Tabela 12 apresenta um resumo dos dados obtidos no estudo de incubação.

Tabela 12 – Percentuais de hidrólise e concentrações máximas de lactulose obtidos após incubação do biocatalisador a 50 °C por 30 minutos em tampão fosfato de potássio (50 mM e pH 7,0), lactose (66,7 g/L) e frutose (133,3 g/L). Condições reacionais: concentração total de substrato = 200 g/L ( $\pm 10$  g/L); tampão fosfato de potássio 50 mM e pH 7,0; 7 U/mL e 120 RPM por 10 min.

	Hidrólise (%)		Lactulose (g/L)	
	25 °C	50 °C	25 °C	50 °C
<b>Controle</b>	94,26 $\pm$ 2,22	94,08 $\pm$ 0,39	8,73 $\pm$ 0,88	13,20 $\pm$ 1,05
<b>Tampão</b>	96,42 $\pm$ 0,35	98,43 $\pm$ 1,02	10,45 $\pm$ 0,16	3,42 $\pm$ 0,15
<b>Lactose</b>	95,92 $\pm$ 0,11	96,94 $\pm$ 2,07	10,23 $\pm$ 0,34	6,82 $\pm$ 0,12
<b>Frutose</b>	95,6 $\pm$ 0,58	97,94 $\pm$ 1,09	8,73 $\pm$ 1,01	6,28 $\pm$ 0,39

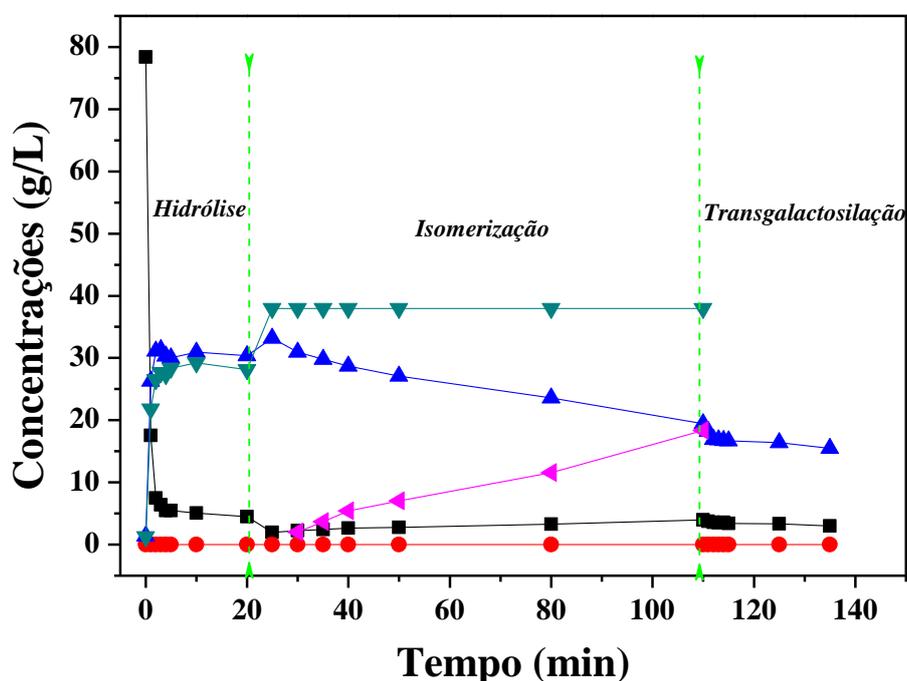
Fonte: O Autor (2021).

Após a análise dos resultados obtidos, foi possível entender um pouco mais o processo de hidrólise e produção de lactulose por  $\beta$ -galactosidase de *K. lactis*, percebendo que uma prévia interação da enzima com os agentes doadores e receptores do complexo galactosil não foi benéfica para o processo de transgalactosilação. O pH neutro não influenciou de maneira significativa, já que nessa faixa de pH a concentração de íons  $H^+$  e  $OH^-$  é balanceada, não gerando qualquer tipo de interação com a enzima e, possivelmente, algum tipo de inibição. De forma geral, o processo de incubação não alterou os índices de hidrólise, mas não foi benéfico para a etapa de transgalactosilação, principalmente na temperatura de 50 °C. Houve uma melhora no processo conduzindo na temperatura de 25 °C. No entanto, tal melhoria não se mostrou superior ao processo conduzido sem a incubação prévia. Por esse motivo, optou-se por não incluir essa etapa de incubação prévia do biocatalisador ao meio reacional. Dessa forma, partiu-se para o desenvolvimento de estratégias de otimização da produção de lactulose, através da integração de processos diferentes, como será apresentado no tópico seguinte.

### 5.5 Avaliação da configuração operacional do processo de produção de lactulose por $\beta$ -galactosidase de *K. lactis* e o uso da glicose isomerase para otimização do processo

Configurações operacionais diferentes foram avaliadas com e sem integração com um processo de isomerização da glicose obtida no processo de hidrólise da lactose utilizando a glicose isomerase de *S. murinus* como biocatalisador. A Figura 27 mostra os resultados obtidos para o primeiro esquema operacional, esquematizado na Figura 17, no tópico de Material e Métodos.

Figura 27 – Processo integrado A: avaliação da hidrólise do soro de leite por  $\beta$ -galactosidase de *K. lactis* immobilizada em quitosana ativada com glutaraldeído, seguida pela isomerização por glicose isomerase de *S. murinus* e, por fim, reação de transgalactosilação com o biocatalisador utilizado no início. Lactose (■); glicose (▲), galactose (▼), frutose (◆) e lactulose (●). Condições reacionais:  $[La]_{\text{inicial}} = 66,7 \text{ g/L} (\pm 5 \text{ g/L})$ ; 7 U/mL; 50 °C; pH 7,0, 120 RPM e 20 minutos (reações com  $\beta$ -galactosidase);  $m_{\text{enz}} = 0,5 \text{ g}$ , pH 7,5, 70 °C, agitação mecânica suave por 90 min (reação com glicose isomerase).



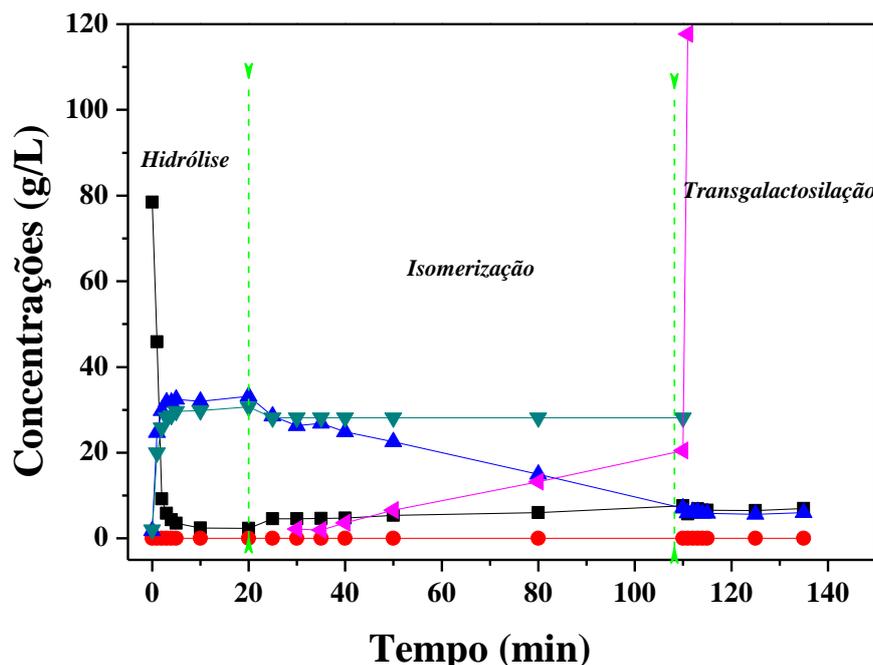
Fonte: O Autor (2021).

A configuração avaliada no Processo A apresentou resultados esperados até o início da reação de transgalactosilação, utilizando o mesmo biocatalisador usado na hidrólise

do início. O percentual de hidrólise do soro de leite obtido da faixa de tempo de 0 a 20 minutos foi de 94,24 %, gerando uma quantidade de glicose e galactose de 30,38 g/L e 28,14 g/L, respectivamente. A partir dos 20 min de reação, deu-se início ao processo de isomerização presente no soro de leite hidrolisado. O percentual médio de glicose isomerizada em frutose foi de 48,55%, gerando uma concentração de frutose de 18,34 g/L e uma quantidade de glicose residual de 19,42 g/L. Ao término dessas duas etapas (hidrólise + isomerização da glicose) obteve-se um meio reacional com a seguinte composição: 3,94 g/L de lactose, 18,34 g/L de glicose, 37,76 g/L de galactose e 18,34 g/L de frutose (aproximadamente 80 g/L de açúcares totais). Se for considerada a razão ótima de lactose:frutose, e que cada molécula de galactose formada veio de uma molécula de lactose hidrolisada, tem-se que a concentração total de lactose no meio seria de aproximadamente 23 g/L. Tal valor requeria uma concentração de frutose 3x maior, ou seja, de aproximadamente 70 g/L de frutose. Logo, a quantidade de frutose presente no meio reacional não seria suficiente para otimizar o processo de transgalactosilação, dificultando a formação de lactulose. E de fato isso foi observado nos resultados expressos na Figura 28. A não formação de lactulose ao término do processo integrado pode ter relação com alguns efeitos, como perda de atividade enzimática entre um processo e outro, inibição enzimática por parte da composição do soro de leite. No entanto, já se sabe que a composição do meio reacional é de fundamental importância no processo de transgalactosilação, ainda mais em casos como este, por se tratar de reações cineticamente controladas. A baixa concentração do nucleófilo pode ter relação direta com a ausência de lactulose ao término da ação integrada.

Para contornar o fato de que o processo de isomerização não gerou a quantidade de frutose necessária para promover as reações de transgalactosilação, optou-se por realizar o mesmo processo, contudo, suplementando a quantidade de frutose necessária para atingir a razão que mais favorece a formação de lactulose (1:2, levando-se em consideração a quantidade inicial de lactose oferecida) e os resultados para esta nova configuração do processo integrado (Processo A com suplementação de frutose) estão apresentados na Figura 28.

Figura 28 - Processo integrado A, com suplementação de frutose: avaliação da hidrólise do soro de leite por  $\beta$ -galactosidase de *K. lactis* imobilizada em quitosana ativada com glutaraldeído, seguida pela isomerização por glicose isomerase de *S. murinus* e, por fim, reação de transgalactosilação com o biocatalisador utilizado no início. Lactose (■); glicose (▲), galactose (▼), frutose (◆) e lactulose (●). Condições reacionais:  $[La]_{\text{inicial}} = 66,7 \text{ g/L} (\pm 5 \text{ g/L})$ ; 7 U/mL; 50 °C; pH 7,0, 120 RPM e 20 minutos (reações com  $\beta$ -galactosidase);  $m_{\text{enz}} = 0,5 \text{ g}$ , pH 7,5, 70 °C, agitação mecânica suave por 90 min (reação com glicose isomerase).



Fonte: O Autor (2021).

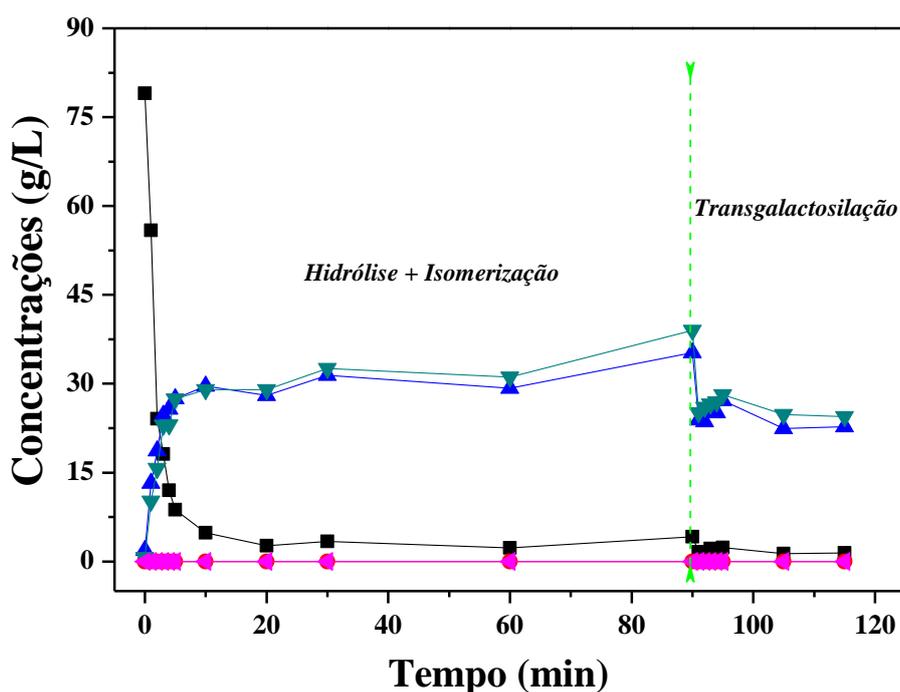
Percebe-se, da análise da Figura 28 que, apesar da suplementação com frutose, também não foi possível obter sucesso na última etapa do processo integrado (transgalactosilação), não sendo detectado a formação de lactulose. A composição do meio reacional disponibilizado para o processo de transgalactosilação foi de 7,44 g/L de lactose, 7,25 g/L de glicose, 28,13 g/L de galactose e 117,71 g/L de frutose, após suplementação. A suplementação foi feita levando-se em consideração a quantidade inicial de lactose oferecida e obedecendo a condição de concentração máxima de açúcares de 200 g/L ( $\pm 10 \text{ g/L}$ ). Analisando-se os 2 últimos gráficos, o que pode ter gerado esse tipo de comportamento pode ser a inibição enzimática por parte de algum composto presente na composição do soro de leite, ou até mesmo uma possível alteração conformacional ou uma desnaturação enzimática causada pelas alterações de meio (temperatura e pH diferentes para cada etapa). Além desses fatores, deve-se levar em conta que há a possibilidade de a enzima agir melhor na presença

de lactose do que na presença da galactose livre, pois sabe-se que a  $\beta$ -galactosidase de *K. lactis* tem grupamentos específicos que conferem uma afinidade maior pela molécula de lactose (DE ANDRADE *et al.*, 2020; RODRÍGUEZ *et al.*, 2006; SPOHNER *et al.*, 2016), fazendo com que sua ausência diminua as chances da formação do complexo enzima-galactosil, fundamental para seguir nas etapas de formação de oligossacarídeos por transgalactosilação.

Além dessa possibilidade, também deve-se levar em conta a possível formação de outros oligossacarídeos diferentes da lactulose. É sabido que o complexo galactosil-enzima tem afinidade por diversos substratos com o grupamento hidroxila disponível para interação. Além dos oligossacarídeos compostos por 2 açúcares, como a lactulose, existem oligossacarídeos de composição trissacarídea, como a rafinose (formada por galactose, glicose e frutose) e os de composição tetrassacarídea, como a estaquiose (formada por duas unidades de galactose, uma de glicose e uma de frutose). A formação desses compostos utiliza a própria lactulose como agente doador e aceptor da porção de galactosil, sendo que esse tipo de reação pode ser catalisada por  $\beta$ -galactosidasas de *K. lactis* (MARTÍNEZ-VILLALUENGA *et al.*, 2008; NGUYEN *et al.*, 2019).

A fim de se sanar a questão da desativação enzimática por conta da alteração do meio, ou até mesmo a perda de subunidades ou alterações conformacionais ocasionadas pelo mesmo fator, o processo B foi realizado (reação de hidrólise e isomerização simultâneas em um mesmo reator, condições favoráveis para  $\beta$ -galactosidase, seguido da transgalactosilação com um novo biocatalisador de  $\beta$ -galactosidase), de modo a minimizar alterações de meio entre uma etapa e outra, a fim de reduzir os possíveis problemas encontrados no Processo A. A Figura 29 apresenta os resultados obtidos para os estudos realizados.

Figura 29 – Processo integrado B: avaliação da hidrólise do soro de leite por  $\beta$ -galactosidase de *K. lactis* imobilizada em quitosana ativada com glutaraldeído, simultaneamente com a isomerização, por glicose isomerase de *S. murinus* e, por fim, reação de transgalactosilação com o biocatalisador utilizado no início. Lactose (■); glicose (▲), galactose (▼), frutose (◄) e lactulose (●). Condições reacionais:  $[La]_{\text{inicial}} = 66,7 \text{ g/L} (\pm 5 \text{ g/L})$ ; 7 U/mL; 50 °C; pH 7,0, 120 RPM e 20 minutos (reações com  $\beta$ -galactosidase);  $m_{\text{enz}} = 0,5 \text{ g}$ , pH 7,5, 70 °C, agitação mecânica suave por 90 minutos (reação com glicose isomerase).



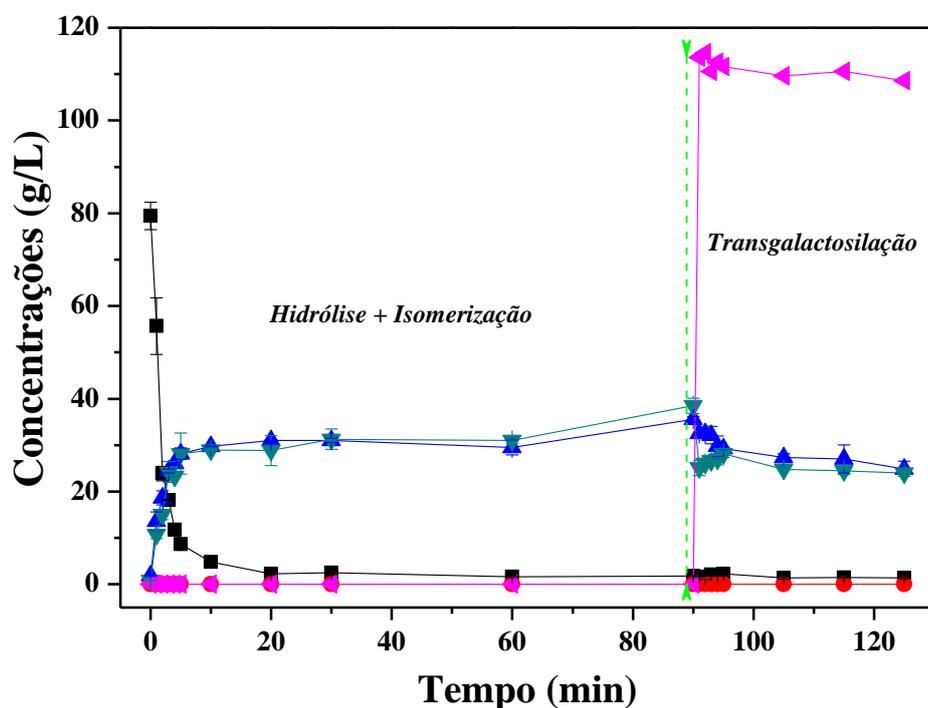
Fonte: O Autor (2021).

No processo integrado B não houve produção de frutose nas condições avaliadas, e, conseqüentemente, não houve produção de lactulose. Apesar de condições de pH semelhantes entre o uso da  $\beta$ -galactosidase e da glicose isomerase (GI), a temperatura utilizada não favoreceu o uso da glicose isomerase, a qual necessita de temperaturas mais elevadas. Não seria possível uma reação em conjunto com as duas enzimas na temperatura de 70 °C (ótima para GI), pois, muito provavelmente, a  $\beta$ -galactosidase passaria por uma desnaturação (a 60 °C já começa o processo de desnaturação enzimática) (NETO *et al.*, 2021). Percebe-se que o processo de hidrólise ocorreu sem nenhuma dificuldade, gerando uma quantidade de 35,27 g/L de glicose e de 38,98 g/L de galactose. Outro ponto importante é que ao término dos 90 minutos de reação ocorre uma redução nas concentrações desses dois açúcares, indicando o consumo para formação de algum outro composto, diferente da

lactulose. O complexo enzima-galactosil formado durante o estado de transição é apto para interação com a própria lactose, com galactose (gerando os galactooligossacarídeos, através da transgalactosilação da lactose) e com a frutose ou outros nucleófilos com estrutura semelhante (GÄNZLE, 2012; VERA; GUERRERO; ILLANES, 2011; XAVIER; RAMANA; SHARMA, 2018), e é muito provável que esteja ocorrendo a formação de algum desses compostos, o que explicaria a redução nessas concentrações.

Como não foi possível a formação de frutose por meio da reação de isomerização da glicose, então optou-se por repetir o processo B com uma etapa de suplementação da frutose, a fim de se avaliar se de fato não ocorreu a síntese da lactulose apenas pela ausência deste monossacarídeo no meio reacional, ou se haveria a influência de outro fator. A Figura 30 apresenta os resultados obtidos do processo B com a suplementação de frutose.

Figura 30 – Processo integrado B, com suplementação de frutose: avaliação da hidrólise do soro de leite por  $\beta$ -galactosidase de *K. lactis* imobilizada em quitosana ativada com glutaraldeído, simultaneamente com a isomerização, por glicose isomerase de *S. murinus* e, por fim, reação de transgalactosilação com o biocatalisador utilizado no início. Lactose (■); glicose (▲), galactose (▼), frutose (◆) e lactulose (●). Condições reacionais: razão La:Fru = 1:2, concentração total de carboidratos = 200 g/L ( $\pm$  10 g/L), 7 U/mL; 50 °C; pH 7,0, 120 RPM e 20 minutos (reações com  $\beta$ -galactosidase);  $m_{enz}$  = 0,5 g, pH 7,5, 70 °C, agitação mecânica suave por 90 minutos (reação com glicose isomerase).



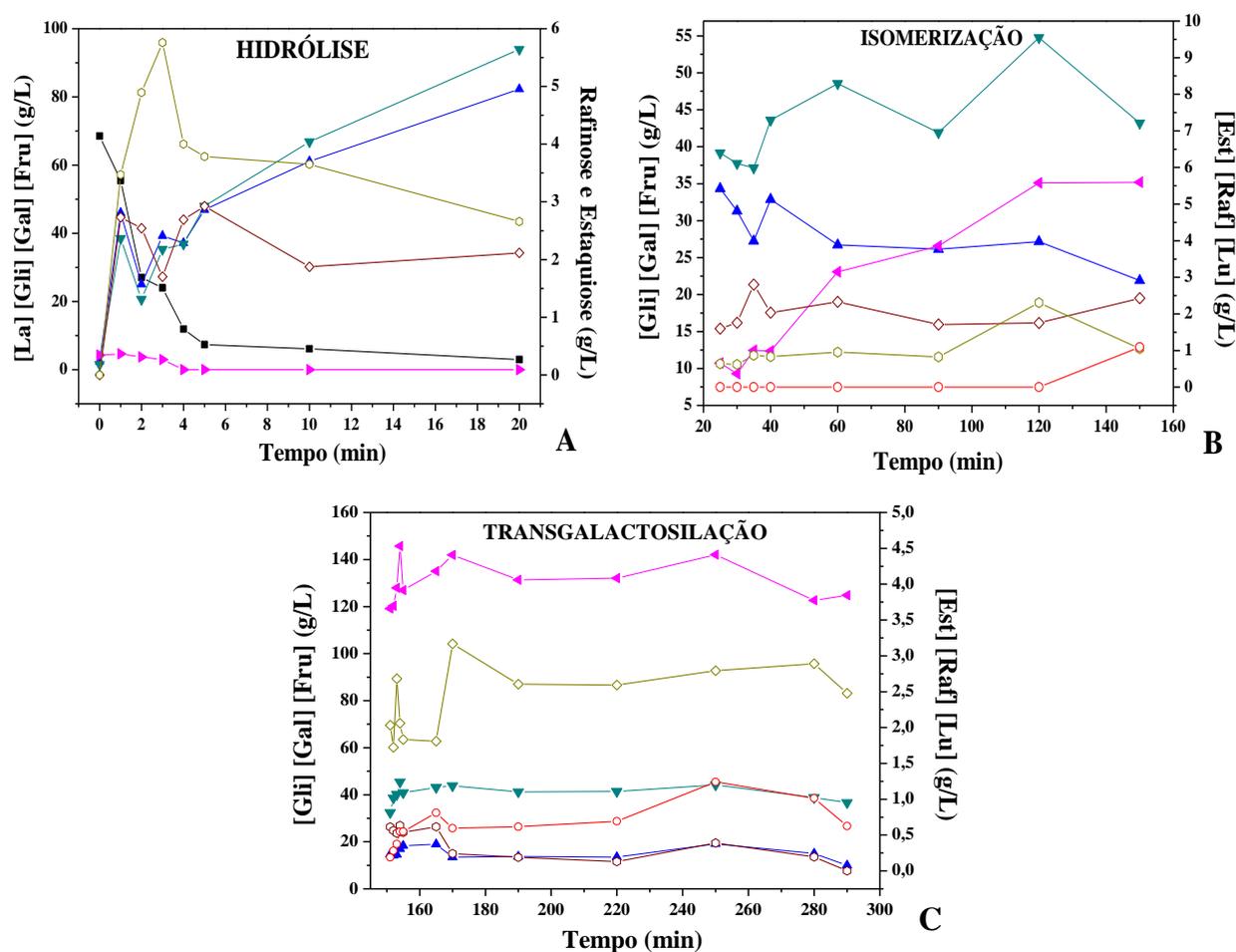
Fonte: O Autor (2021).

O comportamento observado até os 90 minutos de reação é bastante similar ao observado no estudo sem suplementação de frutose. A mesma tendência de queda nas concentrações de glicose e galactose é observada nos últimos 20 minutos da reação. No entanto, mesmo com a suplementação de frutose no meio, não se constatou a formação de lactulose. Na verdade, percebe-se que os níveis de frutose praticamente não mudam durante a etapa de transgalactosilação. Isso mostra que provavelmente algum composto inibitório está presente no meio resultante do processo de hidrólise e isomerização simultâneos, ou que a atividade de transferase está sendo voltada para formação de algum outro composto diferente da lactulose. Também deve-se levar em consideração que a inibição enzimática pela falta da lactose e o excesso de frutose no meio reacional.

Song e colaboradores (2013) realizaram um processo semelhante ao mencionado no presente estudo. Os autores realizaram a produção de lactulose usando o soro de leite como substrato para as reações de hidrólise e transgalactosilação catalisadas por  $\beta$ -galactosidase de *K. lactis* e uma glicose isomerase de *S. rubiginosus* para isomerização da glicose liberada após a hidrólise do soro de leite, no mesmo reator. Os resultados mostraram que o percentual de lactose hidrolisada foi maior em condições nas quais a concentração de lactose era menor, enquanto que o inverso foi observado nas reações de transgalactosilação. Ao avaliar o processo de isomerização, os autores perceberam que para que houvesse um processo mais eficaz seria necessário a utilização de uma maior carga de glicose isomerase na reação. Utilizando a maior razão para glicose isomerase ( $\beta$ -gal:GI = 1:6), foi obtida uma concentração de frutose de 33,9 g/L após 2 horas de reação. Da mesma forma que o observado anteriormente, a taxa de formação de lactulose aumentou com o aumento da frutose no meio (SONG *et al.*, 2013b). Nos processos integrados onde as reações ocorreram em reatores distintos, observou-se que a máxima produção de glicose foi de 18,34 g/L e 20,45 g/L, nos processos sem e com suplementação, respectivamente. Uma diferença média de 42,78 % entre os valores obtidos no presente estudo e o valor obtido nas melhores condições obtidas por Song e colaboradores (2013). Em relação a produção de lactulose, o valor máximo obtido pelos autores foi de 4,81 g/L, na temperatura de 53,5 °C, mostrando que o processo B, no qual utilizou-se os dois biocatalisadores de forma simultânea no mesmo reator, provavelmente associado a pequenas alterações na temperatura e no pH do meio (através do tampão utilizado), possa realizar a etapa de transgalactosilação de forma mais eficaz. Além disso, o observado por Song e colaboradores (2013) em relação à quantidade de lactose presente no meio e redução na capacidade de catalisar as reações de transgalactosilação corrobora para as hipóteses também observadas no presente estudo, confirmando a especificidade da enzima pela molécula de lactose.

Por fim, com o intuito de avaliar o processo A novamente, mas utilizando um biocatalisador virgem (sem aplicação prévia) ao invés de reutilizar o que foi aplicado na etapa de hidrólise inicial, a Figura 31 apresenta o resultado da repetição do estudo em questão.

Figura 31 – Processo integrado A: avaliação da hidrólise do soro de leite por  $\beta$ -galactosidase de *K. lactis* imobilizada em quitosana ativada com glutaraldeído, seguida pela isomerização por glicose isomerase de *S. murinus* e, por fim, reação de transgalactosilação com o biocatalisador virgem. Lactose (■); glicose (▲), galactose (▼), frutose (◆), lactulose (⊖), rafinose (⊕) e estaquiose (◇). Condições reacionais: [La]<sub>inicial</sub> = 66,7 g/L ( $\pm$  5 g/L); 7 U/mL; 50 °C; pH 7,0, 120 RPM e 20 minutos (reações com  $\beta$ -galactosidase);  $m_{enz}$  = 0,5 g, pH 7,5, 70 °C, agitação mecânica suave por 90 min (reação com glicose isomerase).



Fonte: O Autor (2021).

Diferentemente do processo A descrito inicialmente, no qual se fez o reuso do biocatalisador utilizado na etapa de hidrólise, nesse processo percebe-se que houve a formação de lactulose, mesmo que em baixas concentrações, na etapa de transgalactosilação. Além disso, percebe-se que na etapa de hidrólise também houve a formação da estaquiose e da rafinose. A formação desses compostos pode ter sido devido à baixa concentração de frutose presente na composição do soro de leite utilizado (em torno de 4,62 g/L). Essa baixa concentração não favoreceu a formação da lactulose nos estágios iniciais, mas permitiu que

pequenas quantidades de rafinose e estaquiose fossem formadas. Pode-se perceber também que ao passo que a rafinose e a estaquiose eram formadas, as concentrações de glicose e galactose presentes no meio não aumentavam significativamente, mesmo com a hidrólise da lactose ocorrendo (Figura 31.A), devido a tais moléculas serem necessárias para o processo de formação desses oligossacarídeos.

Na etapa de isomerização, foi possível obter uma quantidade significativa de frutose (em média 35,19 g/L) ao término do processo. Um detalhe interessante é que a quantidade de rafinose presente no meio começa a declinar já ao término da etapa da hidrólise (a partir de 4 minutos de reação), indicando uma possível hidrólise reversa desse composto, a qual libera no meio glicose, galactose e frutose. Essa tendência continua nas etapas seguintes, indicando que para produção desse composto, seja necessária sua remoção ao longo do processo.

Mesmo com a etapa de isomerização produzindo níveis satisfatórios de frutose, ainda foi necessário suplementar o meio para a etapa de transgalactosilação, a fim de se garantir uma quantidade de frutose adequada para otimizar a formação da lactulose. Contudo, mesmo com essa suplementação ainda não foi possível obter quantidades significativas desse composto. A concentração máxima de lactulose obtida foi de 1,24 g/L já ao término da reação, indicando que um tempo maior de reação talvez fosse necessário para aumentar os níveis de produção da lactulose, além de provavelmente ser necessário reduzir a quantidade de frutose oferecida e oferecer quantidades pequenas de lactose, a fim da enzima voltar a realizar a hidrólise e, assim, voltar a formar um complexo enzima-galactosil mais estável e disponível para reação de transgalactosilação. Observa-se que, diferentemente da rafinose, a estaquiose produzida na etapa de hidrólise se manteve praticamente constante ao longo das demais etapas, indicando que tais moléculas apresentam uma maior resistência à hidrólise reversa do que as moléculas de rafinose e lactulose. A concentração máxima de estaquiose obtida ao término do processo integrado foi de 3,16 g/L. Isso mostra que uma otimização dos processos avaliados, pode fazer com que os níveis de estaquiose e lactulose ao término do processo possam melhorar.

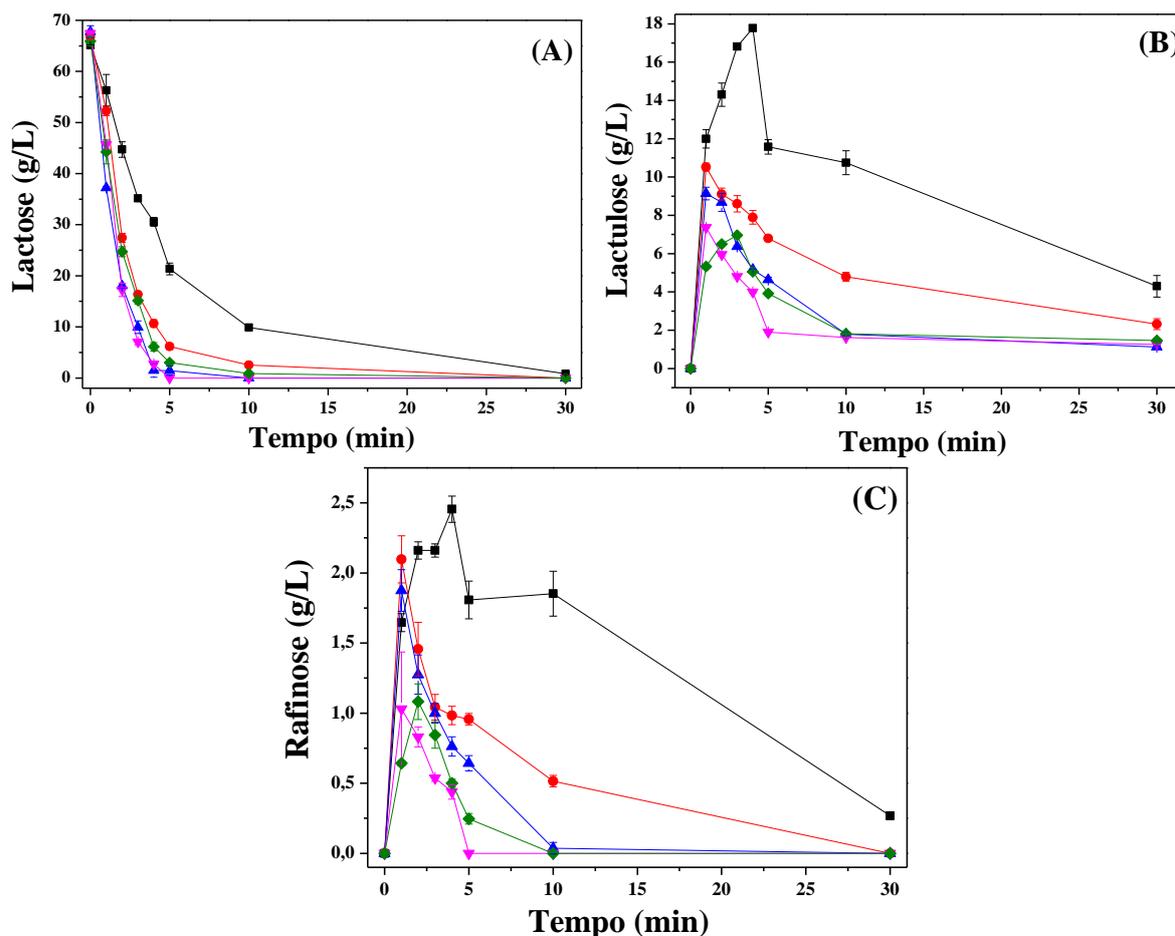
Os resultados expressos até o momento refletem os estudos iniciais sobre a integração de processos para produção de lactulose por  $\beta$ -galactosidase de *K. lactis* utilizando o soro de leite como substrato, mostrando que a produção de lactulose não foi favorecida, mas que houve a produção de outros oligossacarídeos, a exemplo da rafinose e da estaquiose. Além disso, é necessário verificar uma forma de manter a formação do

complexo enzima-galactosil, o qual, provavelmente, necessite rapidamente da molécula receptora do galactosil para formação de oligossacarídeos. Esses resultados levantam a hipótese de que o complexo enzima-galactosil formado durante a hidrólise da lactose, seja bastante reativo e instável, pois caso não reaja num tempo hábil, complexo irá se desfazer, liberando enzima e galactose no meio reacional. Levando-se em consideração esses motivos expostos, é provável que o reuso da  $\beta$ -galactosidase (como proposto no processo A inicial) seja possível e viabilize ainda mais o processo como um todo. Do ponto de vista da isomerização, percebe-se que os índices de glicose isomerizada à frutose foram tanto quanto satisfatórios para as condições avaliadas. Porém, necessitam de uma análise mais detalhada e que leve em conta uma interação com a  $\beta$ -galactosidase.

### **5.6 Avaliação da redução da carga proteica por grama de suporte para otimização da produção de oligossacarídeos**

Como demonstrado nos estudos anteriores, a capacidade hidrolítica da  $\beta$ -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* é alta, o que faz com que a lactose presente no meio seja facilmente e rapidamente hidrolisada em glicose e galactose. Uma outra característica dessa capacidade hidrolítica é que além de hidrolisar a lactose,  $\beta$ -galactosidases também têm a capacidade de realizar hidrólises reversas, nas quais os compostos formados durante o processo de transgalactosilação podem ser também hidrolisados por essa enzima (WEI *et al.*, 2013, 2016; WEIGNEROVÁ; BOJAROVÁ; KREN, 2009). Esse processo de hidrólise reversa funciona de forma semelhante ao processo de hidrólise da lactose, no qual a enzima atua diretamente na ruptura da ligação *o*-glicosídica, formada entre o galactosil e o nucleófilo (no caso da lactulose, a frutose). O estudo em questão foi feito seguindo as mesmas condições ótimas das reações envolvendo a produção de lactulose, porém, reduzindo-se a carga de proteína imobilizada por grama de suporte oferecido. Ou seja, partindo-se da carga ótima de 7 mg de proteína por grama de suporte, a carga proteica foi reduzida para 75 % (5,25 mg/g), 50 % (3,5 mg/g), 25 % (1,75 mg/g) e 10 % (0,7 mg/g) do valor inicial. As atividades obtidas para cada biocatalisador foram:  $45,04 \pm 1,24$ ;  $40,90 \pm 1,51$ ;  $27,76 \pm 1,87$ ;  $25 \pm 1,06$  e  $13,15 \pm 1,03$ , respectivamente. A Figura 32 traz os perfis de hidrólise da lactose e produção de lactulose e rafinose para cada redução de carga avaliada.

Figura 32 – Avaliação da redução da carga proteica utilizada na imobilização de  $\beta$ -galactosidase de *K. lactis* em quitosana ativada com glutaraldeído 0,8 % (v/v). Perfis de hidrólise da lactose (A), produção de lactulose (B) e rafinose (C). Cargas avaliadas: 7 mg/g (◆); 5,25 mg/g (▼); 3,5 mg/g (▲); 1,75 mg/g (●) e 0,7 mg/g (■). Condições reacionais: concentração total de açúcares = 200 g/L; tampão fosfato de potássio pH 7,0 e 100 mM, 120 RPM, 50 C e 30 minutos.



Fonte: O Autor (2021).

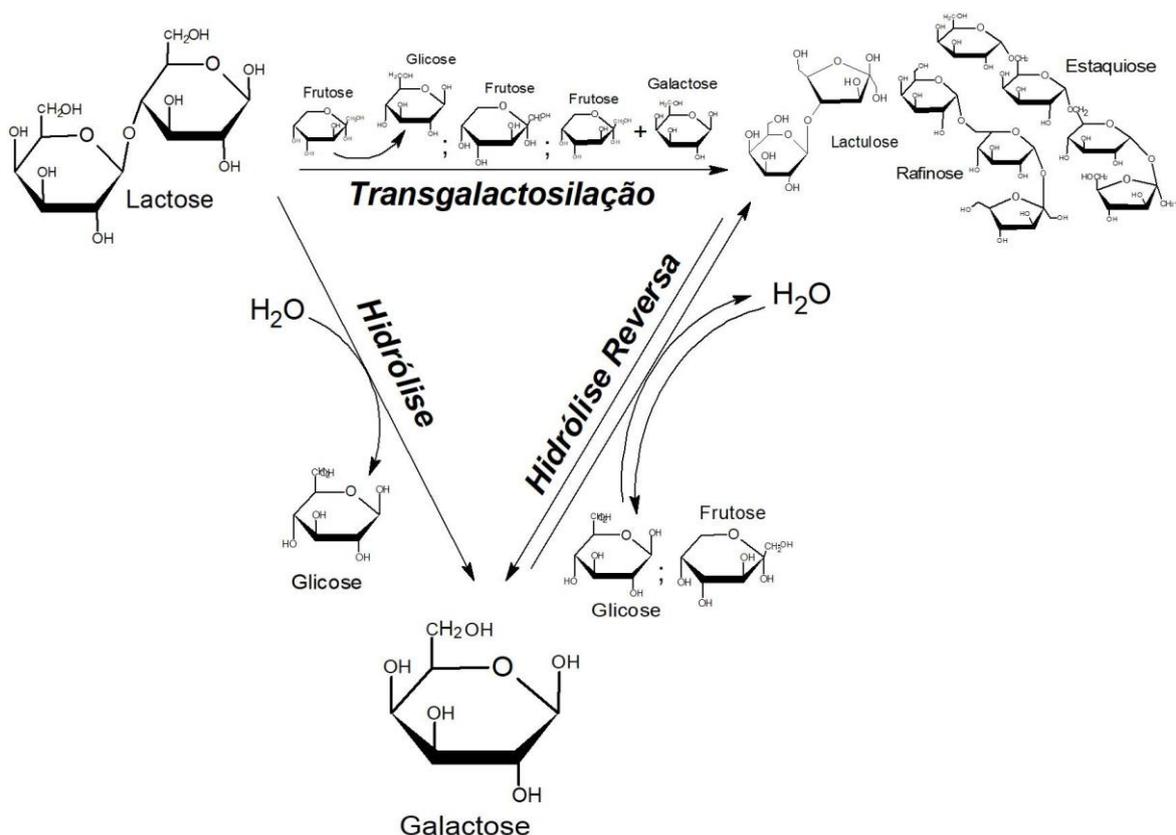
Uma primeira análise da Figura 32.A traz à tona a informação de que o primeiro efeito da redução da carga proteica na imobilização foi uma redução na velocidade de hidrólise da lactose. Percebe-se que nas cargas de 0,7 e 1,75 mg/g, a concentração de lactose no tempo de 5 minutos é 18,9 e 12,26 g/L, respectivamente, enquanto que nos demais percentuais avaliados, os níveis de lactose já estão bem próximos a zero. Contudo, em todas as proporções avaliadas ainda se observa altos percentuais de hidrólise da lactose, a qual tende a zero em todos os casos avaliados. Da análise das Figuras 32.B e 32.C, percebe-se que houve uma influência mais significativa da redução da carga proteica para as reações de

transgalactosilação. Avaliando-se os perfis de produção de lactulose, observa-se que uma tendência de aumento em sua concentração com a redução da proporção enzimática. Nas cargas de 0,7 e 1,75 mg/g, as quantidades máximas de lactulose produzidas foram de 17,51 e 11,09 g/L, respectivamente. Quando comparado com a carga ótima (7m/g), percebe-se um aumento de aproximadamente 125 % obtido na carga de 0,7 mg/g e um aumento de quase 75 % observado na carga de 1,75 mg/g. De forma semelhante foi notado para a produção de rafinose, a qual obteve maiores concentrações também nas menores proporções avaliadas (2,45 g/L para carga de 0,7 mg/g e 2,09 g/L para 1,75 mg/g). Em comparação com o biocatalisador imobilizado com 7 mg/g, a concentração de rafinose aumentou quase 130 % na carga de 0,7 mg/g e 93 % na carga de 1,75 mg/g mostrando que a redução carga proteica favoreceu a produção desses oligossacarídeos.

Tais resultados corroboram para a hipótese de hidrólise reversa dos compostos formados durante a etapa de transgalactosilação. Esse processo de hidrólise reversa ocorre quando uma molécula de água passar a agir como nucleófilo e ataca a molécula de oligossacarídeo formada, fazendo com que a enzima que antes agiu para formação da ligação *o*-glicosídica entre os monossacarídeos necessários para a reação, atue na quebra dessa mesma ligação, liberando tais monossacarídeos (DE ANDRADE *et al.*, 2020; XAVIER; RAMANA; SHARMA, 2018). Uma forma de minimizar os efeitos dessa hidrólise reversa é retirando-se o produto do meio, ao passo que ele é formado; adição de sais ou, como mencionado nos tópicos anteriores, aumentando-se a concentração de um nucleófilo mais ativo do que a água, que nesse caso é a frutose. Tal característica corrobora ainda mais para o fato de que a reação de transgalactosilação catalisada por  $\beta$ -galactosidases de *K. lactis* é cineticamente controlada, como afirmado em tópicos anteriores. Isso porque é fundamental que esteja presente no meio um composto que atue de forma mais competitiva pelo complexo enzima-galactosil do que a própria água presente no meio, reduzindo os efeitos de uma possível inibição competitiva da água pelo complexo enzimático (WEIGNEROVÁ; BOJAROVÁ; KREN, 2009). Tal mecanismo controlado cineticamente, permite também que a quantidade de oligossacarídeos presente no meio reacional após a reação de transgalactosilação possa ser maior do que a necessária para que ocorra apenas um equilíbrio reacional, já que a presença em excesso de um nucleófilo mais competitivo faz com que hidrólise reversa seja minimizada. Contudo, a presença de água é necessária para manter a atividade enzimática, o que contribui tanto para formação quanto para hidrólise dos produtos e limita o controle cinético da reação (HAMILTON, 2004; WEIGNEROVÁ; BOJAROVÁ;

KREN, 2009). Weignerová e colaboradores (2009), trazem em seu estudo observações semelhantes, porém voltadas a enzimas do tipo glicosidases (E.C. 3.2.1.-), as quais possuem comportamento bastante semelhantes com  $\beta$ -galactosidases. Os autores também observaram que o processo de hidrólise catalisado pela glicosidase em questão é termodinamicamente controlado (semelhante à hidrólise catalisada por  $\beta$ -galactosidases) e ocorre na presença de água, a qual atua de acordo com o esquema proposto na Figura 33, a qual também apresenta o esquema de hidrólise reversa dos produtos formados. Os compostos acima das setas e separados por “;” indicam possíveis participantes da reação para formação dos compostos indicados após a seta.

Figura 33 – Esquemas reacionais das etapas de hidrólise, transgalactosilação e hidrólise reversa catalisados por  $\beta$ -galactosidases.



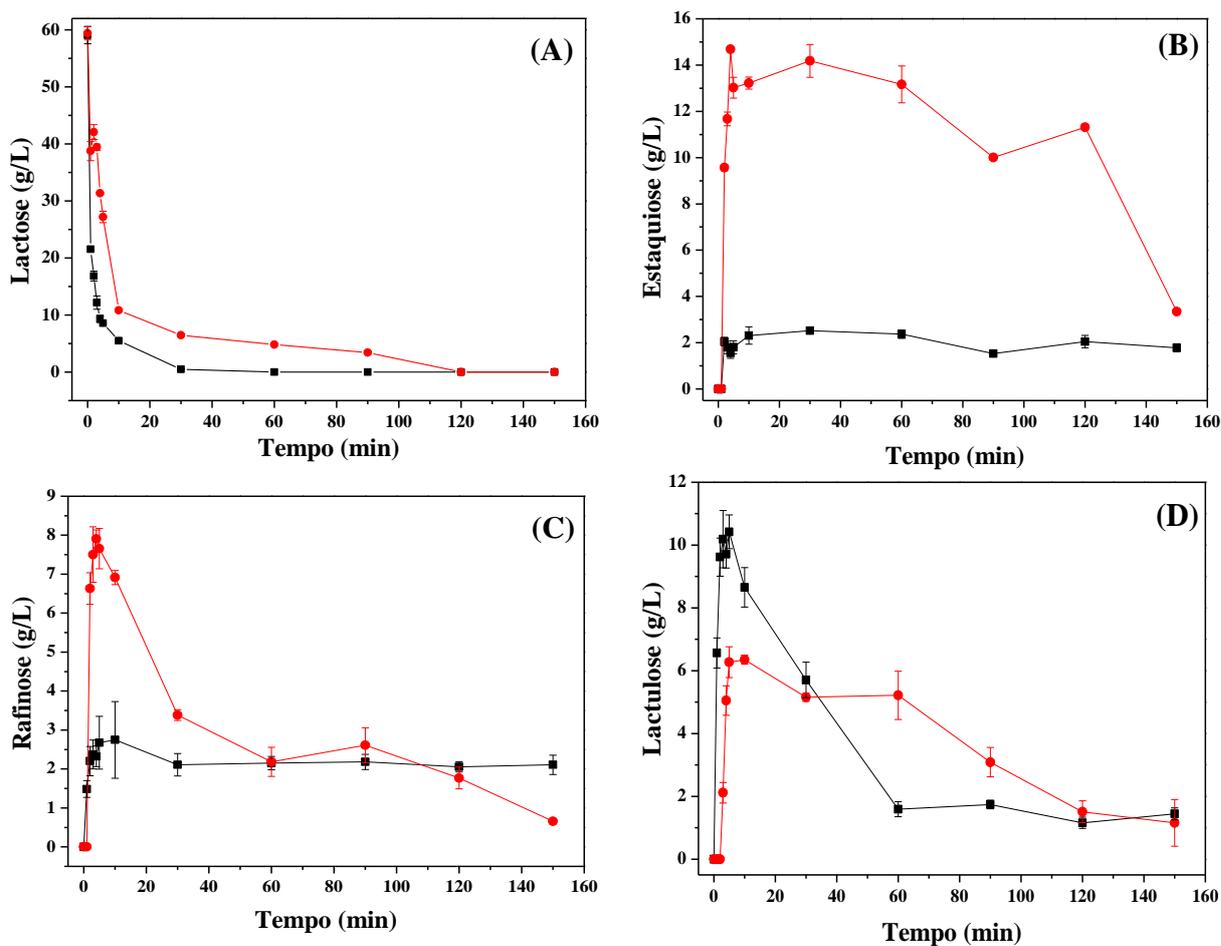
Fonte: Adaptado de WEIGNEROVÁ; BOJAROVÁ; KREN, (2009).

Tal comportamento justifica os resultados obtidos, nos quais observa-se que as quantidades de oligossacarídeos formadas tendem a diminuir com o passar da reação, indicando a hidrólise reversa.

### 5.7 Comparação das reações utilizando $\beta$ -galactosidasas de *Kluyveromyces lactis* e de *Aspergillus oryzae*

Com o intuito de se comparar o processo de formação de oligossacarídeos por  $\beta$ -galactosidasas oriundas de cepas diferentes, realizou-se um estudo, a fim de se observar que tipo de reação tem predominância para cada tipo de  $\beta$ -galactosidase. As condições operacionais foram as mesmas descritas no tópico 4.2.6 de materiais e métodos. A Figura 34 apresenta os resultados obtidos para esse estudo comparativo.

Figura 34 – Comparação entre os perfis de hidrólise da lactose (A), produção de estaquiose (B), rafinose (C) e de lactulose (D) por  $\beta$ -galactosidasas de *Kluyveromyces lactis* (■) e de *Aspergillus oryzae* (●). Condições reacionais: concentração total de açúcares = 200 g/L ( $\pm$  10 g/L); razão de La:Fru = 1:2; tampão fosfato de potássio pH 7,0 e 50 mM; 50 °C, 120 RPM e 150 minutos.



Fonte: O Autor (2021).

A quantidade máxima de lactulose produzida pela  $\beta$ -galactosidase de *K. lactis* foi de  $10,42 \pm 0,37$  g/L, enquanto que a quantidade produzida pela enzima de *A. oryzae* foi de  $6,35 \pm 0,15$  g/L. Apesar de produzir uma quantidade inferior de lactulose, a enzima de *A. oryzae* foi capaz de produzir maiores concentrações de rafinose ( $7,91 \pm 0,45$  g/L) e estaquiose ( $14,68 \pm 0,84$  g/L) do que a  $\beta$ -galactosidase de *K. lactis* ( $2,74 \pm 0,31$  g/L de rafinose e  $2,52 \pm 0,24$  g/L de estaquiose). Esses dados colaboram ainda mais com a hipótese de que a enzima proveniente de *A. oryzae* tem melhor performance na formação de oligossacarídeos do que a  $\beta$ -galactosidase de *K. lactis*. Da Figura 34.A é notável que o perfil de hidrólise de lactose é mais acentuado para a  $\beta$ -galactosidase de *K. lactis*, comprovando sua melhor capacidade hidrolítica. Além disso, a análise das Figuras 34.B, 34.C e 34.D mostram que os oligossacarídeos formados conseguem permanecer por mais tempo no meio reacional nos ensaios com a  $\beta$ -galactosidase de *A. oryzae*, indicando que, provavelmente, por possuir um menor potencial hidrolítico, a hidrólise reversa não seja tão favorecida com é com a enzima de *K. lactis*.

As atividades de transgalactosilação também podem auxiliar na explicação dos resultados obtidos. O valor de atividade de transgalactosilação para  $\beta$ -galactosidase de *K. lactis* obtido foi de aproximadamente  $56.837 \pm 487,32$  U<sub>Lactulose</sub> por grama de enzima. Tal valor reflete bem os resultados obtidos, pois a atividade é menor que a atividade reportada para  $\beta$ -galactosidases de *A. oryzae*, de  $64.590$  U<sub>Lactulose</sub>/g de enzima (VERA; GUERRERO; ILLANES, 2011). Além desse estudo, no trabalho desenvolvido por Guerrero e colaboradores (2015) foram avaliados 11 extratos comerciais de  $\beta$ -galactosidases de diferentes cepas. Os resultados obtidos mostraram que as enzimas provenientes de cepas de *A. oryzae* e *B. circullans* foram as que exibiram maior atividade de transgalactosilação, enquanto que as  $\beta$ -galactosidases oriundas de *K. lactis* apresentaram maior atividade hidrolítica (GUERRERO; VERA; CONEJEROS; *et al.*, 2015).

No entanto, mesmo com uma menor tendência de formação de oligossacarídeos, a  $\beta$ -galactosidase de *K. lactis* apresentou bons resultados no processo de produção de lactulose usando soro de leite como substrato, além de apresentar capacidade catalítica para formação de rafinose e estaquiose, como demonstrado nos estudos anteriores.

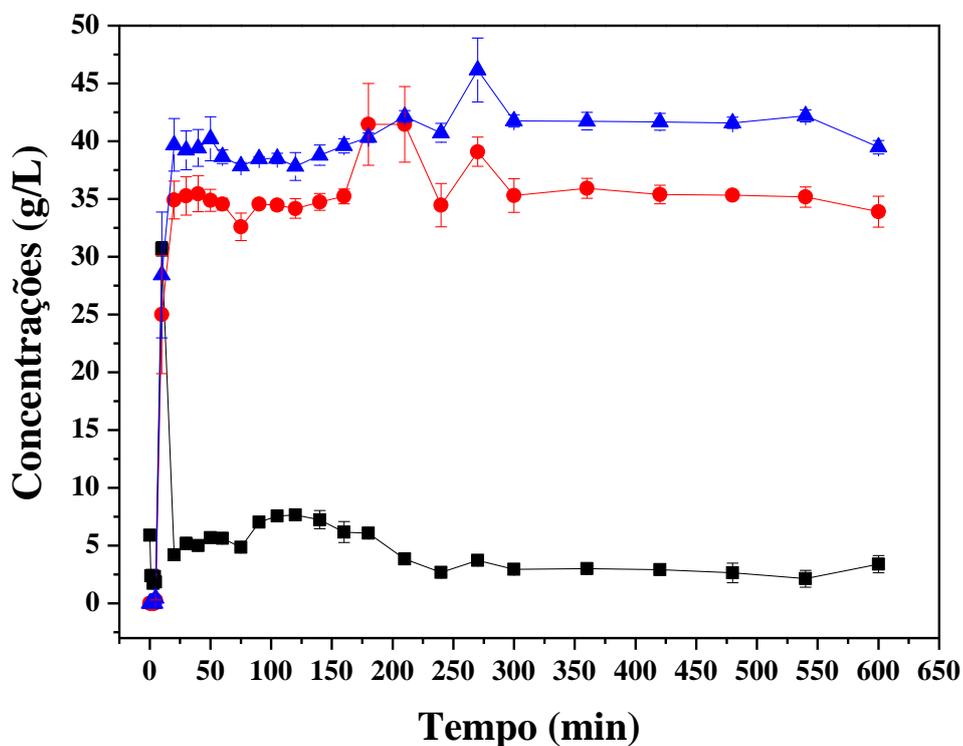
## 5.8 Estudos de produção enzimática de lactulose em modo contínuo em reator de leito fixo

Em um primeiro momento, optou-se por avaliar o comportamento das reações aqui estudadas em um reator de leito fixo. Para tal, utilizou-se as melhores condições obtidas nos estudos anteriores para avaliar uma resposta inicial da mudança de reator ao processo.

### 5.8.1 Avaliação da hidrólise do soro de leite em reator de leito fixo

O processo de hidrólise do soro de leite em reator de leito fixo seguiu as melhores condições obtidas nos estudos preliminares. O intuito desse estudo também é de avaliar o tempo de saturação do leito fixo. A Figura 35 apresenta os resultados obtidos no processo de hidrólise do soro de leite em reator de leito fixo.

Figura 35 – Hidrólise do soro de leite por  $\beta$ -galactosidase de *K. lactis* imobilizada em reator de leito fixo. Condições reacionais:  $m_{\beta\text{-Gal}} = 2$  g;  $h_L = 3$  cm; Carga enzimática do leito = 80 U;  $\tau = 4,7$  minutos;  $t = 10$  horas;  $v = 0,5$  mL/min; 50 °C e pH 7,0. Lactose (■); glicose (●) e galactose (▲).



Fonte: O Autor (2021).

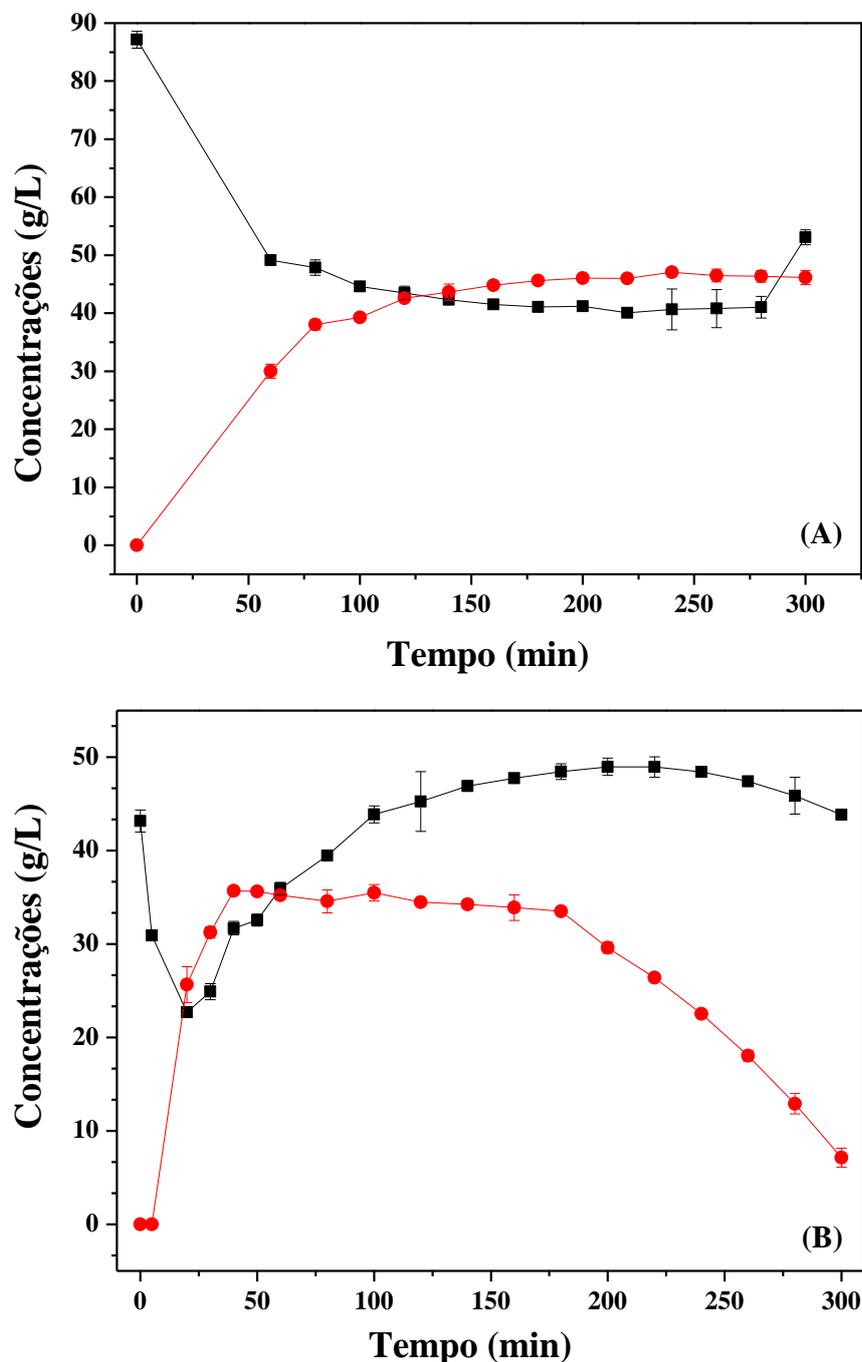
A quantidade de lactose presente no soro de leite fornecido ao leito foi de aproximadamente 84,79 g/L. Como os processos de hidrólise da lactose reportados até aqui ocorrem rapidamente, então durante o tempo que a solução percola o leito fixo, já ocorre a reação de hidrólise, liberando como primeiro ponto visual da lactose uma concentração residual de 30,68 g/L. Dessa forma, o percentual hidrolítico obtido do processo em leito fixo foi de aproximadamente 96%, se mostrando tão eficiente quanto o processo em batelada.

Os maiores níveis de glicose e galactose foram obtidos após 3,5 h de reação (41,64 g/L e 42,14 g/L, respectivamente). Após 50 min de reação, o leito atingiu um estado estacionário, no qual se observou as concentrações de glicose e galactose com poucas variações. Contudo, após 10 h de reação percebeu-se uma alta perda de carga no leito, refletida na redução da vazão de saída. Porém, essa perda de carga não chegou prejudicar o sistema, devido ao tempo em que o leito já vinha em um estado estacionário, ou seja, do início do estado estacionário (após 50 minutos) até a perda de carga ser observada (10 h), o leito passou 9 h em reação contínua e com bons rendimentos, mostrando que o tempo necessário para se atingir o *breakthrough* do leito fixo é bem abaixo das 10 h de reação. Ao término do processo, mediu-se a atividade residual do biocatalisador e ocorreu uma pequena redução, de aproximadamente 4%, no valor inicialmente oferecido (de 41,24 U/g para 39,67 U/g).

Nos estudos realizados por Ricardi e colaboradores (2018) foi avaliada a estabilidade operacional de um leito recheado com uma  $\beta$ -galactosidase de *K. lactis* imobilizada em um suporte composto por uma mistura de sílica e quitosana. Os autores alimentaram um reator de leito fixo com uma solução de lactose pura (50 g/L) em tampão fosfato de potássio 100 mM e pH 7,0 a 37 °C, em uma vazão de 0,3 mL/min, 1,5 gramas do biocatalisador por 200 minutos. Ao término da reação, os autores observaram que a atividade relativa do biocatalisador ainda estava acima dos 90% e que o percentual de glicose liberada foi de 14% (RICARDI *et al.*, 2018), o que demonstra que os resultados obtidos no presente estudo foram superiores.

De forma semelhante, também se avaliou o processo de isomerização em leito fixo. Esse estudo foi feito com glicose pura e com soro de leite previamente hidrolisado em um procedimento em batelada e os resultados estão apresentados na Figura 36.

Figura 36 – Avaliação da isomerização da glicose pura (A) e da glicose presente no soro de leite hidrolisado (B) em reator de leito fixo recheado com glicose isomerase de *S. murinus*. Condições reacionais:  $m_{GI} = 1$  g;  $h_L = 3$  cm; carga enzimática global do leito = 350 U;  $\tau = 11,7$  minutos;  $t = 5$  horas;  $v = 0,2$  mL/min;  $70$  °C e pH 7,0. Glicose (■) e frutose (●).



Fonte: O Autor (2021).

Os resultados expressos nas Figura 36.A e 36.B mostram que o processo de isomerização da glicose por glicose isomerase de *S. murinus* atingiu níveis satisfatórios, já

que os valores de conversão se limitam à faixa de 50%, devido ao caráter reversível da reação, o que permite a isomerização reversa da frutose formada (FABER, 2011). Nos testes envolvendo reagentes puros, é nítida a maior estabilidade da reação ao longo do tempo. A partir dos 120 min de reação já se percebe um estado estacionário da reação, convertendo glicose num percentual de aproximadamente de 50%. Levando-se em conta que a reação de isomerização é reversível e que o percentual teórico máximo está entre 50-60 %, os resultados obtidos se mostram promissores (QUAX, 1993; SEYHAN TÜKEL; ALAGÖZ, 2008; ZHAO, Hong *et al.*, 2016). A concentração final de frutose obtida ao final do processo foi de 46,13 g/L. A partir daí, partiu-se para uma investigação do mesmo processo, mas utilizando soro de leite previamente hidrolisado. As concentrações de lactose, glicose e galactose presentes no meio eram de 0,79 g/L, 43,13 g/L e 30,72 g/L, respectivamente. Portanto, é esperado que a quantidade de frutose produzida seja um pouco menor do que a observada no estudo com glicose pura, já que a concentração de glicose no primeiro estudo foi de aproximadamente 90 g/L.

A análise da Figura 36.B, existe um ponto de contato entre as duas curvas, no qual o a quantidade de glicose volta a subir e a de frutose a baixar. Nesse estudo, a concentração média máxima de frutose obtida foi de 35,19 g/L, na faixa de tempo que vai de 40 a 120 min. A partir daí começa-se a observar a tendência mais acentuada de queda na concentração de frutose. É importante destacar que a glicose isomerase tem a capacidade de realizar a isomerização reversa, fazendo com que a partir de certo ponto ocorra a formação de glicose a partir da frutose, sendo essa uma das possíveis hipóteses. Talvez esse fator seja observado nos estudos com soro de leite, devido a compostos e proteínas (como a  $\beta$ -lactoglobinas,  $\alpha$ -lactoglobinas, soroalbuminas e imunoglobina) presentes na sua composição que favoreçam o processo de isomerização reversa. Outra hipótese é que a redução na concentração de frutose seja por conta da perda de atividade da enzima durante o processo, chegando a não isomerizar mais a glicose, a qual volta a elevar seus níveis. Portanto, um dos primeiros pontos a se concluir da isomerização do soro de leite hidrolisado é que a partir de 60 minutos de reação a taxa de formação de frutose passa a cair, e os níveis de glicose passam a se aproximar da concentração de alimentação do leite.

Neifar e colaboradores (2020) avaliaram a produção de um xarope rico em frutose, feito a partir de um processo de isomerização de glicose, catalisado por uma glicose isomerase de *Caldicoprabacter algeriensis* imobilizada em esferas de *Sepharose*®, e aplicaram o biocatalisador obtido em um processo contínuo com leite fixo. A reação foi

conduzida na vazão de 0,03 mL/min ( $\tau = 33$  minutos), 70 °C e com uma solução de 50 g/L de glicose. Após 2 h de reação, observaram um percentual de conversão de 46,5%, obtendo um rendimento máximo de 49,1% após 48 horas de reação (NEIFAR *et al.*, 2020). Os resultados obtidos por esses autores mostram que o processo proposto no presente estudo de fato foi mais eficaz, levando-se em conta o tempo de reação e o percentual de glicose isomerizada ao longo do processo.

Os estudos com reatores de leito fixo se mostraram promissores, em especial nas etapas de hidrólise e isomerização. Tais resultados poderão ser utilizados em aplicações futuras, visando a otimização da produção de oligossacarídeos por  $\beta$ -galactosidase de *K. lactis*.

## 6 CONCLUSÕES

Os estudos realizados buscaram avaliar e compreender o processo de produção de lactulose por via enzimática, utilizando  $\beta$ -galactosidase como biocatalisador. No primeiro momento, observou-se que a melhor carga de imobilização enzimática foi de 7 mg/g, a qual apresentou um rendimento de imobilização de 88,59 %, gerando um biocatalisador com uma atividade de 46,47 U/g.

A partir daí, partiu-se para uma avaliação da influência que os substratos exercem sobre a enzima, mais precisamente nas etapas de hidrólise de transgalactosilação. Nesse estudo, obteve-se como melhores parâmetros as razões de 1:2 e de 1:3 (La:Fru), tanto para os estudos com reagentes puros, quanto para os estudos com soro de leite. As diferenças observadas entre tais parâmetros foram consideradas mínimas, levando a escolha da razão de 1:2, tendo em vista que por não apresentar diferenças significativas, não seria economicamente viável o uso de mais frutose nas reações dos estudos seguintes. Além de baratear as despesas iniciais, tal fator contribui para uma viabilidade econômica futura, após determinar-se uma viabilidade técnica eficaz e condizente com o objetivo proposto.

Os estudos para se avaliar a influência de processos incubatórios do biocatalisador, levaram em conta possíveis alterações conformacionais causadas pela incubação na temperatura de 50 °C e em diferentes meios, contendo os substratos que compunham o meio reacional. Nos estudos envolvendo a temperatura, primeiramente se determinou sua influência sob o processo, chegando à conclusão que a temperatura de 50 °C foi a que apresentou melhores níveis de hidrólise de produção de lactulose, também observado na avaliação da estabilidade operacional do biocatalisador na mesma temperatura. Feito isso, os efeitos observados no processo incubatório a 50 °C mostraram resultados negativos, no que diz respeito a produção de lactulose, indicando que a incubação prévia à temperatura ótima não melhorou o rendimento da etapa de transgalactosilação. Além disso, a avaliação da estabilidade operacional dos biocatalisadores submetidos a incubação a 50 °C, mostrou reduções nos percentuais de hidrólise e de transgalactosilação, principalmente nas temperaturas de 37 e 50 °C, sendo esta última a que mais sofreu influência negativa.

De forma semelhante, os resultados obtidos nos estudos de incubação no meio reacional mostraram que não houve alterações no biocatalisador que gerassem uma otimização do processo. Os percentuais hidrolíticos se mostraram indiferentes às mudanças nas condições avaliadas, enquanto que a produção de lactulose foi reduzida em todas as condições avaliadas, quando comparada ao estudo de controle.

Nos estudos dos processos integrados, observou-se que o processo A obteve resultados melhores quando se utilizou um biocatalisador virgem para etapa de transgalactosilação. Os resultados mostraram que a etapa de isomerização foi boa, no entanto não foi capaz de fornecer uma quantidade de frutose suficiente para, na etapa de transgalactosilação, favorecer a formação de oligossacarídeos, como lactulose e rafinose. Tais compostos ainda foram sintetizados, mas em baixas concentrações (1,24 e 3,16 g/L, respectivamente), indicando que se necessitam de novas alterações na etapa de transgalactosilação para sua otimização.

No estudo de redução da carga enzimática, observou-se uma melhora na produção de lactulose e rafinose em proporções menores de enzima por grama de suporte oferecido, indicando que possivelmente a alta capacidade hidrolítica da enzima faça com que ocorram processos de hidrólise reversa, nos quais os produtos formados da reação de transgalactosilação são hidrolisados em seus monossacarídeos estruturais.

Na avaliação da atividade de transgalactosilação ficou constatado o que já se esperava, devido aos resultados obtidos nos estudos anteriores: um valor de atividade um pouco menor, quando comparado a atividade de  $\beta$ -galactosidases de cepas como *Aspergillus oryzae* e *Bacillus circulans*. A atividade de transgalactosilação obtida para  $\beta$ -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* foi de 56.837 U<sub>Lactulose</sub> por grama de enzima.

Um estudo comparativo, entre a  $\beta$ -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* e a de *Aspergillus oryzae* deixou ainda mais claro a alta capacidade hidrolítica que a primeira enzima tem, e a alta capacidade de transgalactosilação da segunda enzima. Os resultados mostraram que além disso,  $\beta$ -galactosidases de *A. oryzae* possuem uma melhor capacidade em resistir à hidrólise reversa, diferentemente da enzima de *K. lactis*. Além disso, ambas enzimas se mostraram capazes de sintetizar outros tipos de oligossacarídeos, como foi o caso da rafinose e da estaquiase, obtidos nas mesmas condições reacionais usadas para produção de lactulose.

Os estudos em reator de leito fixo mostraram resultados satisfatórios em relação aos estudos de hidrólise do soro de leite e isomerização do soro de leite hidrolisado. Os resultados obtidos mostraram que após 50 min de reação, o sistema atinge um estado permanente, no qual não se observa variações significativas nas concentrações de glicose e galactose, sendo os valores máximos obtidos de 41,64 e 42,14 g/L, respectivamente. O ponto de *breakthrough* do leito foi antes das 10 horas de reação. Além da hidrólise, realizou-se

também a isomerização no leite fixo, a qual gerou uma quantidade final de frutose de 46,13 g/L, após 120 minutos de reação.

O processo de produção de oligossacarídeos utilizando  $\beta$ -galactosidase de *K. lactis* imobilizada em quitosana ativada com glutaraldeído 0,8 % (v/v) e soro de leite como substrato mostrou resultados satisfatórios em determinadas condições. As condições e configurações operacionais influenciaram na performance da reação, bem como o uso de um subproduto da indústria de laticínios, agregando valor e destinando-o a um processo de produção de compostos de interesse econômico, como a lactulose, rafinose e a estaquiiose. Deve-se ser levado em conta que são poucos os estudos que avaliam a produção da rafinose e da estaquiiose por via enzimática, sendo o presente estudo um ponto de partida para avaliações mais profundas sobre a obtenção desses oligossacarídeos.

A partir desse estudo espera-se contribuir para a obtenção de outros tipos de oligossacarídeos, levando-se em conta as observações e conclusões observadas na presente tese.

## REFERÊNCIAS

- ABURTO, Carla; GUERRERO, Cecilia; VERA, Carlos; ILLANES, Andrés. Improvement in the yield and selectivity of lactulose synthesis with *Bacillus circulans*  $\beta$ -galactosidase. **Lwt**, vol. 118, no. October 2019, p. 108746, 2020. DOI 10.1016/j.lwt.2019.108746. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108746>.
- ADACHI, Susumu. A rapid method for the assay of lactulose. **Analytical Biochemistry**, 1965. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(65\)90151-X](https://doi.org/10.1016/0003-2697(65)90151-X).
- ADACHI, Susumu. Formation of lactulose and tagatose from lactose in strongly heated milk [16]. **Nature**, 1958. <https://doi.org/10.1038/181840a0>.
- ADLERCREUTZ, Patrick. Immobilisation and application of lipases in organic media. **Chemical Society Reviews**, vol. 42, no. 15, p. 6406, 2013. <https://doi.org/10.1039/c3cs35446f>.
- AIDER, Mohammed; HALLEUX, Damien de. Isomerization of lactose and lactulose production: review. **Trends in Food Science and Technology**, vol. 18, no. 7, p. 356–364, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2007.03.005>.
- AL-SHERAJI, Sadeq Hasan; ISMAIL, Amin; MANAP, Mohd Yazid; MUSTAFA, Shuhaimi; YUSOF, Rokiah Mohd; HASSAN, Fouad Abdulrahman. Prebiotics as functional foods: A review. **Journal of Functional Foods**, vol. 5, no. 4, p. 1542–1553, 2013. DOI 10.1016/j.jff.2013.08.009. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2013.08.009>.
- ALBUQUERQUE, Tiago Lima de. **PRODUÇÃO ENZIMÁTICA DE LACTULOSE A PARTIR DE SORO DE LEITE UTILIZANDO A ENZIMA  $\beta$ -GALACTOSIDASE DE *Kluyveromyces lactis***. 2018. 155 f. Universidade Federal do Ceará, 2018.
- ALONSO, Saúl; RENDUELES, Manuel; DÍAZ, Mario. Simultaneous production of lactobionic and gluconic acid in cheese whey/glucose co-fermentation by *Pseudomonas taetrolens*. **Bioresource Technology**, vol. 196, p. 314–323, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.07.092>.
- ANGYAL, Stephen J. The Lobry de Bruyn-Alberda van Ekenstein Transformation and Related Reactions. [S. l.: s. n.], 2001. [https://doi.org/10.1007/3-540-44422-x\\_1](https://doi.org/10.1007/3-540-44422-x_1).
- ANSARI, Shakeel Ahmed; HUSAIN, Qayyum. Immobilization of *Kluyveromyces lactis*  $\beta$  galactosidase on concanavalin A layered aluminium oxide nanoparticles - Its future aspects in biosensor applications. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, vol. 70, no. 3–4, p. 119–126, 2011. DOI 10.1016/j.molcatb.2011.02.016. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcatb.2011.02.016>.
- ANSARI, Shakeel Ahmed; SATAR, Rukhsana. Recombinant  $\beta$ -galactosidases - Past, present and future: A mini review. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, vol. 81, p. 1–6, 2012. DOI 10.1016/j.molcatb.2012.04.012. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcatb.2012.04.012>.
- APPELS, Lise; BAEYENS, Jan; DEGRÈVE, Jan; DEWIL, Raf. Principles and potential of the anaerobic digestion of waste-activated sludge. **Progress in Energy and Combustion Science**, vol. 34, no. 6, p. 755–781, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.peccs.2008.06.002>.

ARAÚJO, Emiliane A.; DE CARVALHO, Antônio F.; LEANDRO, Eliana S.; FURTADO, Mauro M.; DE MORAES, Célia A. Development of a symbiotic cottage cheese added with *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 and inulin. **Journal of Functional Foods**, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2009.12.002>.

AZZOUNI, D.; ELOUTASSI, N.; LAHKIMI, A.; LOUASTE, B.; CHAOUCH, M. Production of the bioenergy from the industrial waste. **Materials Today: Proceedings**, vol. 13, p. 607–614, 2019. DOI 10.1016/j.matpr.2019.04.019. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2019.04.019>.

BARBOSA, Oveimar; ORTIZ, Claudia; BERENGUER-MURCIA, Ángel; TORRES, Rodrigo; RODRIGUES, Rafael C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto. Glutaraldehyde in bio-catalysts design: A useful crosslinker and a versatile tool in enzyme immobilization. **RSC Advances**, vol. 4, no. 4, p. 1583–1600, 2014. <https://doi.org/10.1039/c3ra45991h>.

BARBOSA, Oveimar; ORTIZ, Claudia; BERENGUER-MURCIA, Ángel; TORRES, Rodrigo; RODRIGUES, Rafael C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto. Strategies for the one-step immobilization–purification of enzymes as industrial biocatalysts. **Biotechnology Advances**, vol. 33, no. 5, p. 435–456, Sep. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.03.006>.

BATISTA, A. L.D.; SILVA, R.; CAPPATO, L. P.; FERREIRA, M. V.S.; NASCIMENTO, K. O.; SCHMIELE, M.; ESMERINO, E. A.; BALTHAZAR, C. F.; SILVA, H. L.A.; MORAES, J.; PIMENTEL, T. C.; FREITAS, M. Q.; RAICES, R. S.L.; SILVA, M. C.; CRUZ, A. G. Developing a synbiotic fermented milk using probiotic bacteria and organic green banana flour. **Journal of Functional Foods**, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.09.037>.

BECERRA, M.; CERDÁN, E.; GONZÁLEZ SISO, M. I. Dealing with different methods for *Kluyveromyces lactis*  $\beta$ -galactosidase purification. **Biological Procedures Online**, vol. 1, no. 1, p. 48–58, 1998. <https://doi.org/10.1251/bpo4>.

BERNAL, Claudia; MARCIELLO, Marzia; MESA, Monica; SIERRA, Ligia; FERNANDEZ-LORENTE, Gloria; MATEO, Cesar; GUIBAN, Jose M. Immobilisation and stabilisation of  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* using a glyoxyl support. **International Dairy Journal**, vol. 28, no. 2, p. 76–82, 2013. DOI 10.1016/j.idairyj.2012.08.009. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.idairyj.2012.08.009>.

BERNAL, Claudia; SIERRA, Ligia; MESA, Monica. Design of  $\beta$ -galactosidase/silica biocatalysts: Impact of the enzyme properties and immobilization pathways on their catalytic performance. **Engineering in Life Sciences**, vol. 14, no. 1, p. 85–94, 2014. <https://doi.org/10.1002/elsc.201300001>.

BETANCOR, Lorena; LÓPEZ-GALLEGO, Fernando; HIDALGO, Aurelio; ALONSO-MORALES, Noelia; DELLAMORA-ORTIZ, Gisela; CESARMATEO, Gisela Dellamora Ortiz; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, Roberto; GUIBÁN, Jose M. Different mechanisms of protein immobilization on glutaraldehyde activated supports: Effect of support activation and immobilization conditions. **Enzyme and Microbial Technology**, vol. 39, no. 4, p. 877–882, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2006.01.014>.

BIANCHI, G. P.; DE MITRI, M. S.; BUGIANESI, E.; ABBIATI, R.; FABBRI, A.; MARCHESSINI, G. Lowering effects of a preparation containing fibres and lactulose on glucose and insulin levels in obesity. **Italian Journal of Gastroenterology**, 1994. .

BIANCHI, G.; RONCHI, M.; MARCHESINI, G. Effect of lactulose on carbohydrate metabolism and diabetes mellitus. **Scandinavian Journal of Gastroenterology, Supplement**, 1997. <https://doi.org/10.1080/00365521.1997.11720721>.

BIRO, Emese; BRATILOVEANU, Gianina; TODEA, Anamaria; PETER, Francisc. Synthesis of galacto-oligosaccharides by immobilized  $\beta$ -galactosidase using alkyl or aryl substituted silane precursors for efficient sol-gel entrapment. **New Biotechnology**, vol. 33, p. S104, 2016. DOI 10.1016/j.nbt.2016.06.1084. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nbt.2016.06.1084>.

BIRO, Emese; BUDUGAN, Daniel; TODEA, Anamaria; PETER, Francisc; KLÉBERT, Szilvia; FECZKÓ, Tivadar. Recyclable solid-phase biocatalyst with improved stability by sol-gel entrapment of  $\beta$ -d-galactosidase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, vol. 123, p. 81–90, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2015.11.006>.

BOON, M. A.; JANSSEN, A. E.M.; VAN 'T RIET, K. Effect of temperature and enzyme origin on the enzymatic synthesis of oligosaccharides. **Enzyme and Microbial Technology**, vol. 26, no. 2–4, p. 271–281, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(99\)00167-2](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(99)00167-2).

BOON, M. A.; VANT RIET, K.; JANSSEN, A. E.M. Enzymatic synthesis of oligosaccharides: Product removal during a kinetically controlled reaction. **Biotechnology and Bioengineering**, vol. 70, no. 4, p. 411–420, 2000. [https://doi.org/10.1002/1097-0290\(20001120\)70:4<411::AID-BIT6>3.0.CO;2-W](https://doi.org/10.1002/1097-0290(20001120)70:4<411::AID-BIT6>3.0.CO;2-W).

BORNSCHEUER, Uwe T. Immobilizing enzymes: How to create more suitable biocatalysts. **Angewandte Chemie - International Edition**, 2003. <https://doi.org/10.1002/anie.200301664>.

BOSSO, Alessandra; IGLECIAS SETTI, Ana Caroline; TOMAL, Adriana Bosso; GUEMRA, Samuel; MORIOKA, Luiz Rodrigo Ito; SUGUIMOTO, Hélio Hiroshi. Substrate consumption and beta-galactosidase production by *Saccharomyces fragilis* IZ 275 grown in cheese whey as a function of cell growth rate. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, vol. 21, no. June, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101335>.

BOUDRANT, Joseph; WOODLEY, John M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto. Parameters necessary to define an immobilized enzyme preparation. **Process Biochemistry**, vol. 90, no. November 2019, p. 66–80, 2020. DOI 10.1016/j.procbio.2019.11.026. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.11.026>.

BUDRIENE, Saulute; GOROCHOVCEVA, Natalija; ROMASKEVIC, Tatjana; YUGOVA, Lyubov V.; MIEZELIENE, Aldona; DIENYS, Gervydas; ZUBRIENE, Asta.  $\beta$ -Galactosidase from *Penicillium canescens*. Properties and immobilization. **Central European Journal of Chemistry**, vol. 3, no. 1, p. 95–105, 2005. <https://doi.org/10.2478/BF02476241>.

CAPELA, P.; HAY, T. K.C.; SHAH, N. P. Effect of cryoprotectants, prebiotics and microencapsulation on survival of probiotic organisms in yoghurt and freeze-dried yoghurt. **Food Research International**, vol. 39, no. 2, p. 203–211, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2005.07.007>.

CASAL, E.; MONTILLA, A.; MORENO, F. J.; OLANO, A.; CORZO, N. Use of chitosan for selective removal of  $\beta$ -lactoglobulin from whey. **Journal of Dairy Science**, vol. 89, no. 5, p. 1384–1389, 2006. DOI 10.3168/jds.S0022-0302(06)72206-8. Available at: [http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72206-8](http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72206-8).

CASTELLÓ, E.; GARCÍA Y SANTOS, C.; IGLESIAS, T.; PAOLINO, G.; WENZEL, J.; BORZACCONI, L.; ETCHEBEHERE, C. Feasibility of biohydrogen production from cheese whey using a UASB reactor: Links between microbial community and reactor performance. **International Journal of Hydrogen Energy**, vol. 34, no. 14, p. 5674–5682, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.05.060>.

CHOI, Han Suk; YANG, Xiaoguang; KIM, Dong Sup; YANG, Ji Hyun; HAN, Sung Ok; PARK, Chulhwan; KIM, Seung Wook. Power generation from cheese whey using enzymatic fuel cell. **Journal of Cleaner Production**, vol. 254, p. 120181, 2020. DOI 10.1016/j.jclepro.2020.120181. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.120181>.

CORNELL, R. P. Endogenous gut-derived bacterial endotoxin tonically primes pancreatic secretion of insulin in normal rats. **Diabetes**, 1985. <https://doi.org/10.2337/diab.34.12.1253>.

CRITTENDEN, R. G.; PLAYNE, M. J. Production, properties and applications of food-grade oligosaccharides. **Trends in Food Science and Technology**, vol. 7, no. 11, p. 353–361, 1996. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(96\)10038-8](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(96)10038-8).

DA SILVA CAMPELLO, Graciella; TRINDADE, Renata Aguirre; RÉGO, Tatiane Vieira; DE MEDEIROS BURKERT, Janaína Fernandes; BURKERT, Carlos André Veiga. Immobilization of  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* on eupergit® c and properties of the biocatalyst. **International Journal of Food Engineering**, vol. 8, no. 3, 2012. <https://doi.org/10.1515/1556-3758.2760>.

DÁVILA, Izaskun; GULLÓN, Beatriz; ALONSO, José Luis; LABIDI, Jalel; GULLÓN, Patricia. Vine shoots as new source for the manufacture of prebiotic oligosaccharides. **Carbohydrate Polymers**, vol. 207, no. October 2018, p. 34–43, 2019. DOI 10.1016/j.carbpol.2018.11.065. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.11.065>.

DE ALBUQUERQUE, Tiago Lima; GOMES, Sandy Danielle Lucindo; D'ALMEIDA, Alan Portal; FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto; GONÇALVES, Luciana Rocha Barros; ROCHA, Maria Valderez Ponte. Immobilization of  $\beta$ -galactosidase in glutaraldehyde-chitosan and its application to the synthesis of lactulose using cheese whey as feedstock. **Process Biochemistry**, vol. 73, no. August, p. 65–73, 2018. DOI 10.1016/j.procbio.2018.08.010. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.08.010>.

DE ANDRADE, Bruna C.; TIMMERS, Luis F.S.M.; RENARD, Gaby; VOLPATO, Giandra; DE SOUZA, Cláucia F.V. Microbial  $\beta$ -Galactosidases of industrial importance: Computational studies on the effects of point mutations on the lactose hydrolysis reaction. **Biotechnology Progress**, no. December 2019, p. 1–9, 2020. <https://doi.org/10.1002/btpr.2982>.

DE FREITAS, Maria de Fátima Matos; HORTÊNCIO, Lucas C.; DE ALBUQUERQUE, Tiago Lima; ROCHA, Maria Valderez Ponte; GONÇALVES, Luciana Rocha Barros. Simultaneous hydrolysis of cheese whey and lactulose production catalyzed by  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* NRRL Y1564. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, vol. 43, no. 4, p. 711–722, 2020. DOI 10.1007/s00449-019-02270-y. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00449-019-02270-y>.

DE PAULA, L.a; ROLIM, M.M.a; NETO, E.B.b; SOARES, T.M.c; PEDROSA, E.M.R.a; E SILVA, Ê.F.F.a. Growth and mineral nutrition of forage corn cultivated hydroponically with serum of cow milk. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, vol. 15, no. 9, p. 931–939, 2011. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-80054879694&partnerID=40&md5=c1dca7904f412fc531f67838a5e425f0>.

DESAI, Nivas M.; MARTHA, Glory S.; HAROHALLY, Nanishankar V.; MURTHY, Pushpa S. Non-digestible oligosaccharides of green coffee spent and their prebiotic efficiency. **Lwt**, vol. 118, no. July 2019, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108784>.

DI SERIO, M.; MATURO, C.; DE ALTERIIS, E.; PARASCANDOLA, P.; TESSER, R.; SANTACESARIA, E. Lactose hydrolysis by immobilized  $\beta$ -galactosidase: The effect of the supports and the kinetics. **Catalysis Today**, vol. 79–80, p. 333–339, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0920-5861\(03\)00059-2](https://doi.org/10.1016/S0920-5861(03)00059-2).

DIAMOND, T.; ROWLANDS, B. J. Endotoxaemia in obstructive jaundice: the role of gastrointestinal bile flow. **Surgical Research Communications**, 1989. .

DICOSIMO, Robert; MCAULIFFE, Joseph; POULOSE, Ayrookaran J; BOHLMANN, Gregory. Industrial use of immobilized enzymes. **Chemical Society Reviews**, vol. 42, no. 15, p. 6437, Aug. 2013. <https://doi.org/10.1039/c3cs35506c>.

DUARTE, Lovaine Silva; SCHÖFFER, Jéssie da Natividade; LORENZONI, André Soibelman Glock; RODRIGUES, Rafael C.; RODRIGUES, Eliseu; HERTZ, Plinho Francisco. A new bioprocess for the production of prebiotic lactosucrose by an immobilized  $\beta$ -galactosidase. **Process Biochemistry**, vol. 55, p. 96–103, 2017. DOI 10.1016/j.procbio.2017.01.015. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2017.01.015>.

EMBRAPA. Leite de vacas felizes. **Anuário do Leite**, no. 34 art, p. 104, 2020. .

EMBRAPA. Sua Excelência, O Consumidor: Novos Produtos E Novas Estratégias Da Cadeia Do Leite Para Ganhar Competitividade E Conquistar Os Clientes Finais. **Anuario Leite**, no. 35 art, p. 104, 2019. .

ESCALANTE, H.; CASTRO, L.; AMAYA, M. P.; JAIMES, L.; JAIMES-ESTÉVEZ, J. Anaerobic digestion of cheese whey: Energetic and nutritional potential for the dairy sector in developing countries. **Waste Management**, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2017.09.026>.

FABER, Mariana De Oliveira. **Isomerização Enzimática de Glicose a Frutose em Biorreator de Leito Fixo Alimentado Continuamente**. 2011. 92 f. Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2011.

FACIN, Bruno R.; MORET, Bruna; BARETTA, Dilmar; BELFIORE, Laurence A.; PAULINO, Alexandre T. Immobilization and controlled release of  $\beta$ -galactosidase from chitosan-grafted hydrogels. **Food Chemistry**, vol. 179, p. 44–51, 2015. DOI 10.1016/j.foodchem.2015.01.088. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.01.088>.

FASSINA, Patricia; NUNES, Gabriela Quadros; ADAMI, Fernanda Scherer; GOETTERT, Márcia Inês; DE SOUZA, Cláudia Fernanda Volken. Importance of cheese whey processing: Supplements for sports activities - A review. **Polish Journal of Food and Nutrition Sciences**, 2019. <https://doi.org/10.31883/pjfn-2019-0008>.

FATTAHI, Hosein; ASHTIANI, Farzin Zokae; BONAKDARPOUR, Babak; HASHEMI, Seyed Abdolreza; KHATAMI, Seyed Hadi. Enzymatic synthesis of lactulose by commercial  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. **Afinidad**, 2010. .

FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto. Stabilization of multimeric enzymes: Strategies to prevent subunit dissociation. **Enzyme and Microbial Technology**, vol. 45, no. 6–7, p. 405–418, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2009.08.009>.

FERNÁNDEZ-LAFUENTE, Roberto; RODRÍGUEZ, Verónica; MATEO, Cesar; PENZOL, Guadalupe; HERNÁNDEZ-JUSTIZ, Odette; IRAZOQUI, Gabriela; VILLARINO, Andrea; OVSEJEVI, Karen; BATISTA, Francisco; GUISÁN, José M. Stabilization of multimeric enzymes via immobilization and post-immobilization techniques. 7., 1999. **Journal of Molecular Catalysis - B Enzymatic** [...]. [S. l.: s. n.], 1999. vol. 7, p. 181–189. [https://doi.org/10.1016/S1381-1177\(99\)00028-4](https://doi.org/10.1016/S1381-1177(99)00028-4).

FINEGOLD, Sydney M.; LI, Zhaoping; SUMMANEN, Paula H.; DOWNES, Julia; THAMES, Gail; CORBETT, Karen; DOWD, Scot; KRAK, Michael; HEBER, David. Xylooligosaccharide increases bifidobacteria but not lactobacilli in human gut microbiota. **Food and Function**, vol. 5, no. 3, p. 436–445, 2014. <https://doi.org/10.1039/c3fo60348b>.

FISCHER, Christin; KLEINSCHMIDT, Thomas. Synthesis of Galactooligosaccharides in Milk and Whey: A Review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, vol. 17, no. 3, p. 678–697, 2018. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12344>.

FISCHER, Christin; KLEINSCHMIDT, Thomas. Synthesis of galactooligosaccharides using sweet and acid whey as a substrate. **International Dairy Journal**, vol. 48, p. 15–22, 2015. DOI 10.1016/j.idairyj.2015.01.003. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.idairyj.2015.01.003>.

FONTES, Edimar A.F.; PASSOS, Flávia M.L.; PASSOS, Frederico J.V. A mechanistical mathematical model to predict lactose hydrolysis by  $\beta$ -galactosidase in a permeabilized cell mass of *Kluyveromyces lactis*: Validity and sensitivity analysis. **Process Biochemistry**, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(01\)00211-4](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(01)00211-4).

GANAI, Mohd Anis; GUPTA, Uma Shanker; KANGO, Naveen. Screening of biocatalysts for transformation of sucrose to fructooligosaccharides. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2013.07.008>.

GÄNZLE, Michael G. Enzymatic synthesis of galacto-oligosaccharides and other lactose derivatives (hetero-oligosaccharides) from lactose. **International Dairy Journal**, vol. 22, no. 2, p. 116–122, 2012. DOI 10.1016/j.idairyj.2011.06.010. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.idairyj.2011.06.010>.

GARMAN, J.; COOLBEAR, T.; SMART, J. The effect of cations on the hydrolysis of lactose and the transferase reactions catalysed by  $\beta$ -galactosidase from six strains of lactic acid bacteria. **Applied Microbiology and Biotechnology**, vol. 46, no. 1, p. 22–27, 1996. <https://doi.org/10.1007/s002530050778>.

GENNARI, Adriano; MOBAYED, Francielle H.; DA ROLT NERVIS, Brenda; BENVENUTTI, Edilson V.; NICOLODI, Sabrina; DA SILVEIRA, Nádyá Pesce; VOLPATO, Giandra; VOLKEN DE SOUZA, Cláucia F. Immobilization of  $\beta$ -Galactosidases on Magnetic Nanocellulose: Textural, Morphological, Magnetic, and Catalytic Properties. **Biomacromolecules**, vol. 20, no. 6, p. 2315–2326, 2019. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.9b00285>.

GENNARI, Adriano; MOBAYED, Francielle Herrmann; CATTO, André Luis; BENVENUTTI, Edilson Valmir; VOLPATO, Giandra; VOLKEN DE SOUZA, Cláudia Fernanda. *Kluyveromyces lactis*  $\beta$ -galactosidase immobilized on collagen: catalytic stability on batch and packed-bed reactor hydrolysis. **Reaction Kinetics, Mechanisms and Catalysis**, vol. 127, no. 2, p. 583–599, 2019. DOI 10.1007/s11144-019-01598-6. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11144-019-01598-6>.

GHALY, A. E. A comparative study of anaerobic digestion of acid cheese whey and dairy manure in a two-stage reactor. **Bioresource Technology**, vol. 58, no. 1, p. 61–72, 1996. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(96\)00105-8](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(96)00105-8).

GIBSON, Glenn R.; PROBERT, Hollie M.; LOO, Jan Van; RASTALL, Robert A.; ROBERFROID, Marcel B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. **Nutrition Research Reviews**, 2004. <https://doi.org/10.1079/nrr200479>.

GIBSON, Glenn R.; RASTALL, Robert A. **Prebiotics: Development & Application**. [S. l.: s. n.], 2012. <https://doi.org/10.1002/9780470023150>.

GIRALDO, J.; ALTHAUS, R. L.; BELTRÁN, M. C.; MOLINA, M. P. Antimicrobial activity in cheese whey as an indicator of antibiotic drug transfer from goat milk. **International Dairy Journal**, vol. 69, p. 40–44, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2017.02.003>.

GONZÁLEZ-CATAÑO, Flor; TOVAR-CASTRO, Luz; CASTAÑO-TOSTADO, Eduardo; REGALADO-GONZALEZ, Carlos; GARCÍA-ALMENDAREZ, Blanca; CARDADOR-MARTÍNEZ, Anaberta; AMAYA-LLANO, Silvia. Improvement of covalent immobilization procedure of  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* for galactooligosaccharides production: Modeling and kinetic study. **Biotechnology Progress**, vol. 33, no. 6, p. 1568–1578, 2017. <https://doi.org/10.1002/btpr.2509>.

GONZÁLEZ SISO, M. I. The biotechnological utilization of cheese whey: A review. **Bioresource Technology**, vol. 57, no. 1, p. 1–11, 1996. [https://doi.org/10.1016/0960-8524\(96\)00036-3](https://doi.org/10.1016/0960-8524(96)00036-3).

GUERRERO, Cecilia; ILLANES, Andrés. **Enzymatic production of other lactose-derived prebiotic candidates**. [S. l.]: Elsevier Inc., 2016. DOI 10.1016/B978-0-12-802724-0.00006-8. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-802724-0.00006-8>.

GUERRERO, Cecilia; SÚAREZ, Sebastián; ABURTO, Carla; UBILLA, Claudia; RAMÍREZ, Nicolás; VERA, Carlos; ILLANES, Andrés. Comparison of batch and repeated batch operation of lactulose synthesis with cross-linked aggregates of *Bacillus circulans*  $\beta$ -galactosidase. **Process Biochemistry**, no. December 2019, Apr. 2020. DOI 10.1016/j.procbio.2020.04.025. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359511319318823>.

GUERRERO, Cecilia; VALDIVIA, Felipe; UBILLA, Claudia; RAMÍREZ, Nicolás; GÓMEZ, Matías; ABURTO, Carla; VERA, Carlos; ILLANES, Andrés. Continuous enzymatic synthesis of lactulose in packed-bed reactor with immobilized *Aspergillus oryzae*  $\beta$ -galactosidase. **Bioresource Technology**, vol. 278, no. December 2018, p. 296–302, 2019. DOI 10.1016/j.biortech.2018.12.018. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.12.018>.

GUERRERO, Cecilia; VERA, Carlos; ACEVEDO, Fernando; ILLANES, Andrés. Simultaneous synthesis of mixtures of lactulose and galacto-oligosaccharides and their selective fermentation. **Journal of Biotechnology**, vol. 209, p. 31–40, 2015. DOI 10.1016/j.jbiotec.2015.06.394. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2015.06.394>.

GUERRERO, Cecilia; VERA, Carlos; CONEJEROS, Raúl; ILLANES, Andrés. Transgalactosylation and hydrolytic activities of commercial preparations of  $\beta$ -galactosidase for the synthesis of prebiotic carbohydrates. **Enzyme and Microbial Technology**, vol. 70, p. 9–17, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2014.12.006>.

GUERRERO, Cecilia; VERA, Carlos; ILLANES, Andrés. Fed-batch operation for the synthesis of lactulose with B-galactosidase of *Aspergillus oryzae*. **Bioresource Technology**, vol. 237, p. 126–134, 2017a. DOI 10.1016/j.biortech.2017.01.042. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2017.01.042>.

GUERRERO, Cecilia; VERA, Carlos; ILLANES, Andrés. Synthesis of lactulose in batch and repeated-batch operation with immobilized B-galactosidase in different agarose functionalized supports. **Bioresource Technology**, vol. 230, p. 56–66, 2017b. DOI 10.1016/j.biortech.2017.01.037. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2017.01.037>.

GUERRERO, Cecilia; VERA, Carlos; PLOU, Francisco; ILLANES, Andrés. Influence of reaction conditions on the selectivity of the synthesis of lactulose with microbial  $\beta$ -galactosidases. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, vol. 72, no. 3–4, p. 206–212, 2011. DOI 10.1016/j.molcatb.2011.06.007. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcatb.2011.06.007>.

GUERRERO, Cecilia; VERA, Carlos; SERNA, Nestor; ILLANES, Andrés. Immobilization of *Aspergillus oryzae* B-galactosidase in an agarose matrix functionalized by four different methods and application to the synthesis of lactulose. **Bioresource Technology**, vol. 232, p. 53–63, 2017. DOI 10.1016/j.biortech.2017.02.003. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2017.02.003>.

GUERRERO, Cecilia; WILSON, Lorena. **Enzymatic production of lactulose**. [S. l.]: Elsevier Inc., 2016. DOI 10.1016/B978-0-12-802724-0.00005-6. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-802724-0.00005-6>.

GUGGISBERG, D.; PICCINALI, P.; SCHREIER, K. Effects of sugar substitution with Stevia, Actilight<sup>TM</sup> and Stevia combinations or Palatinose<sup>TM</sup> on rheological and sensory characteristics of low-fat and whole milk set yoghurt. **International Dairy Journal**, vol. 21, no. 9, p. 636–644, 2011. DOI 10.1016/j.idairyj.2011.03.010. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.idairyj.2011.03.010>.

GULEWICZ, P.; CIESIOLKA, D.; FRIAS, J.; VIDAL-VALVERDE, C.; FREJNAGEL, S.; TROJANOWSKA, K.; GULEWICZ, K. Simple method of isolation and purification of  $\alpha$ -galactosides from legumes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2000. <https://doi.org/10.1021/jf000210v>.

HAIDER, Toshiba; HUSAIN, Qayyum. Calcium alginate entrapped preparations of *Aspergillus oryzae*  $\beta$  galactosidase: Its stability and applications in the hydrolysis of lactose. **International Journal of Biological Macromolecules**, vol. 41, no. 1, p. 72–80, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2007.01.001>.

HAIDER, Toshiba; HUSAIN, Qayyum. Immobilization of  $\beta$ -galactosidase by bioaffinity adsorption on concanavalin A layered calcium alginate-starch hybrid beads for the hydrolysis of lactose from whey/milk. **International Dairy Journal**, vol. 19, no. 3, p. 172–177, 2009. DOI 10.1016/j.idairyj.2008.10.005. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.idairyj.2008.10.005>.

HAJEK, Jan; MURZIN, Dmitry Yu; SALMI, Tapio; MIKKOLA, Jyri Pekka. Interconversion of lactose to lactulose in alkaline environment: Comparison of different catalysis concepts. 2013. **Topics in Catalysis** [...]. [S. l.: s. n.], 2013. <https://doi.org/10.1007/s11244-013-0044-z>.

HAMILTON, Chris J. Enzymes in preparative mono- and oligo-saccharide synthesis. **Natural Product Reports**, vol. 21, no. 3, p. 365–385, 2004. <https://doi.org/10.1039/b210901h>.

HANEFELD, Ulf; GARDOSI, Lucia; MAGNER, Edmond. Understanding enzyme immobilisation. **Chem. Soc. Rev.**, vol. 38, no. 2, p. 453–468, 2009. <https://doi.org/10.1039/B711564B>.

HASLER, Clare M. Functional foods: Their role in disease prevention and health promotion. **Food Technology**, 1998. .

HELEN SHIPHRAH, Vethakanraj; SAHU, Sayanti; RANJAN THAKUR, Ashoke; RAY CHAUDHURI, Shaon. Screening of bacteria for lactic acid production from whey water. **American Journal of Biochemistry and Biotechnology**, vol. 9, no. 2, p. 118–123, 2013. <https://doi.org/10.3844/ajbbbsp.2013.118.123>.

HERNANDEZ-HERNANDEZ, Oswaldo; CÔTÉ, Gregory L.; KOLIDA, Sofia; RASTALL, Robert A.; SANZ, M. Luz. In vitro fermentation of alternansucrase raffinose-derived oligosaccharides by human gut bacteria. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, vol. 59, no. 20, p. 10901–10906, 2011. <https://doi.org/10.1021/jf202466s>.

HOJNIK, Cornelia; MÜLLER, Anne; GLOE, Tobias Elias; LINDHORST, Thisbe K.; WRODNIGG, Tanja M. The Amadori Rearrangement for Carbohydrate Conjugation: Scope and Limitations. **European Journal of Organic Chemistry**, vol. 2016, no. 25, p. 4328–4337, 2016. <https://doi.org/10.1002/ejoc.201600458>.

HUA, Xiao; YANG, Ruijin; SHEN, Qiuyun; YE, Fayin; ZHANG, Wenbin; ZHAO, Wei. Production of 1-lactulose and lactulose using commercial  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* in the presence of fructose. **Food Chemistry**, vol. 137, no. 1–4, p. 1–7, 2013. DOI 10.1016/j.foodchem.2012.10.003. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.10.003>.

HUERTA, Leopoldo Martín; VERA, Carlos; GUERRERO, Cecilia; WILSON, Lorena; ILLANES, Andrés. Synthesis of galacto-oligosaccharides at very high lactose concentrations with immobilized  $\beta$ -galactosidases from *Aspergillus oryzae*. **Process Biochemistry**, vol. 46, no. 1, p. 245–252, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2010.08.018>.

HUSAIN, Qayyum; ANSARI, Shakeel Ahmed; ALAM, Fahad; AZAM, Ameer. Immobilization of *Aspergillus oryzae*  $\beta$  galactosidase on zinc oxide nanoparticles via simple adsorption mechanism. **International Journal of Biological Macromolecules**, vol. 49, no. 1, p. 37–43, 2011. DOI 10.1016/j.ijbiomac.2011.03.011. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2011.03.011>.

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Indicadores IBGE - Contas nacionais trimestrais. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE**, 2020. .

ILLANES, Andrés. **Future trends and concluding remarks**. [S. l.]: Elsevier Inc., 2016. DOI 10.1016/B978-0-12-802724-0.00008-1. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-802724-0.00008-1>.

ILLANES, Andrés; GUERRERO, Cecilia. **Functional foods and feeds: Probiotics, prebiotics, and synbiotics**. [S. l.]: Elsevier Inc., 2016. DOI 10.1016/B978-0-12-802724-0.00002-0. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-802724-0.00002-0>.

ILLANES, Andrés; VERA, Carlos; WILSON, Lorena. **Enzymatic production of galacto-oligosaccharides**. [S. l.]: Elsevier Inc., 2016. DOI 10.1016/B978-0-12-802724-0.00004-4. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-802724-0.00004-4>.

ÍSPIRLI, Hümeýra; BOWMAN, Michael J.; SKORY, Christopher D.; DERTLI, Enes. Synthesis and characterization of Bifidogenic raffinose-derived oligosaccharides via acceptor reactions of glucansucrase E81. **Lwt**, vol. 147, no. April, p. 1–7, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111525>.

JASKARI, J.; KONTULA, P.; SIITONEN, A.; JOUSIMIES-SOMER, H.; MATTILA-SANDHOLM, T.; POUTANEN, K. Oat  $\beta$ -glucan and xylan hydrolysates as selective substrates for Bifidobacterium and Lactobacillus strains. **Applied Microbiology and Biotechnology**, vol. 49, no. 2, p. 175–181, 1998. <https://doi.org/10.1007/s002530051155>.

JOCHEMS, Peter; MUELLER, Tobias; SATYAWALI, Yamini; DIELS, Ludo; DEJONGHE, Winnie; HANEFELD, Ulf. Active site titration of immobilized beta-galactosidase for the determination of active enzymes. **Biochemical Engineering Journal**, vol. 93, no. 2015, p. 137–141, 2014. DOI 10.1016/j.bej.2014.10.007. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2014.10.007>.

JOCHEMS, Peter; SATYAWALI, Yamini; VAN ROY, Sandra; DOYEN, Wim; DIELS, Ludo; DEJONGHE, Winnie. Characterization and optimization of  $\beta$ -galactosidase immobilization process on a mixed-matrix membrane. **Enzyme and Microbial Technology**, vol. 49, no. 6–7, p. 580–588, 2011. DOI 10.1016/j.enzmictec.2011.06.010. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.enzmictec.2011.06.010>.

JOHANSEN, Helle Nygaard; GLITSØ, Vibe; BACH KNUDSEN, Knud Erik. Influence of extraction solvent and temperature on the quantitative determination of oligosaccharides from plant materials by high-performance liquid chromatography. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 1996. <https://doi.org/10.1021/jf950482b>.

JOHNSON, Casey R.; THAVARAJAH, Dil; COMBS, Gerald F.; THAVARAJAH, Pushparajah. Lentil (*Lens culinaris* L.): A prebiotic-rich whole food legume. **Food Research International**, vol. 51, no. 1, p. 107–113, 2013. DOI 10.1016/j.foodres.2012.11.025. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2012.11.025>.

JOVANOVIC-MALINOVSKA, Ruzica; KUZMANOVA, Slobodanka; WINKELHAUSEN, Eleonora. Application of ultrasound for enhanced extraction of prebiotic oligosaccharides from selected fruits and vegetables. **Ultrasonics Sonochemistry**, vol. 22, p. 446–453, 2015. DOI 10.1016/j.ultsonch.2014.07.016. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ultsonch.2014.07.016>.

JUERS, D. H.; HEIGHTMAN, T. D.; VASELLA, A.; MCCARTER, J. D.; MACKENZIE, L.; WITHERS, S. G.; MATTHEWS, B. W. A structural view of the action of *Escherichia coli* (lacZ)  $\beta$ -galactosidase. **Biochemistry**, vol. 40, no. 49, p. 14781–14794, 2001. <https://doi.org/10.1021/bi011727i>.

JUERS, Douglas H.; MATTHEWS, Brian W.; HUBER, Reuben E. LacZ  $\beta$ -galactosidase: Structure and function of an enzyme of historical and molecular biological importance. **Protein Science**, vol. 21, no. 12, p. 1792–1807, 2012. <https://doi.org/10.1002/pro.2165>.

KACZYŃSKI, Łukasz K.; CAIS-SOKOLIŃSKA, Dorota; SZWENGIEL, Artur. Kinetics of lactose hydrolysis and galactooligosaccharides formation in beverages based on goat's milk and its permeate. **Food Science and Biotechnology**, vol. 28, no. 5, p. 1529–1534, 2019. <https://doi.org/10.1007/s10068-019-00600-0>.

KANEKO, Toshiyuki; KOHMOTO, Takanobu; KIKUCHI, Hiroe; SHIOTA, Masao; IINO, Hisakazu; MITSUOKA, Tomotari. Effects of Isomaltooligosaccharides with Different Degrees of Polymerization on Human Fecal Bifidobacteria. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, vol. 58, no. 12, p. 2288–2290, 1994. <https://doi.org/10.1271/bbb.58.2288>.

KARANFILIAN, Briette Verken; PARK, Taeyang; SENATORE, Frank. Minimal Hepatic Encephalopathy. **Clinics in Liver Disease**, vol. 24, no. 2, p. 209–218, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.cld.2020.01.012>.

KHAN, Maryam; HUSAIN, Qayyum; BUSHRA, Rani. Immobilization of  $\beta$ -galactosidase on surface modified cobalt/multiwalled carbon nanotube nanocomposite improves enzyme stability and resistance to inhibitor. **International Journal of Biological Macromolecules**, vol. 105, p. 693–701, 2017. DOI 10.1016/j.ijbiomac.2017.07.088. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.07.088>.

KHATAMI, Seyyedhadi; ZOKAEE ASHTIANI, Farzin; BONAKDARPOUR, Babak; MEHRDAD, Mahsa. The enzymatic production of lactulose via transglycosylation in conventional and non-conventional media. **International Dairy Journal**, vol. 34, no. 1, p. 74–79, 2014. DOI 10.1016/j.idairyj.2013.07.010. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.idairyj.2013.07.010>.

KIM, Jung Eun; KIM, Yeong Su; KANG, Lin Woo; OH, Deok Kun. Characterization of a recombinant cellobiose 2-epimerase from *Dictyoglomus turgidum* that epimerizes and isomerizes  $\beta$ -1,4- and  $\alpha$ -1,4-gluco-oligosaccharides. **Biotechnology Letters**, vol. 34, no. 11, p. 2061–2068, 2012. <https://doi.org/10.1007/s10529-012-0999-z>.

KIM, Yeong Su; KIM, Jung Eun; OH, Deok Kun. Borate enhances the production of lactulose from lactose by cellobiose 2-epimerase from *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*. **Bioresource Technology**, vol. 128, p. 809–812, 2013. DOI 10.1016/j.biortech.2012.10.060. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.060>.

KIM, Yeong Su; PARK, Chang Su; OH, Deok Kun. Lactulose production from lactose and fructose by a thermostable  $\beta$ -galactosidase from *Sulfolobus solfataricus*. **Enzyme and Microbial Technology**, vol. 39, no. 4, p. 903–908, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.enzmtec.2006.01.023>.

KLEIN, Manuela P.; FALLAVENA, Lucas P.; SCHÖFFER, Jéssie Da N.; AYUB, Marco A.Z.; RODRIGUES, Rafael C.; NINOW, Jorge L.; HERTZ, Plinho F. High stability of immobilized  $\beta$ -d-galactosidase for lactose hydrolysis and galactooligosaccharides synthesis. **Carbohydrate Polymers**, vol. 95, no. 1, p. 465–470, 2013. DOI 10.1016/j.carbpol.2013.02.044. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.02.044>.

KLEIN, Manuela P.; HACKENHAAR, Camila R.; LORENZONI, André S.G.; RODRIGUES, Rafael C.; COSTA, Tania M.H.; NINOW, Jorge L.; HERTZ, Plinho F. Chitosan crosslinked with genipin as support matrix for application in food process: Support characterization and  $\beta$ -d-galactosidase immobilization. **Carbohydrate Polymers**, vol. 137, p. 184–190, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.10.069>.

KONDO, Takako; SAIGO, Saori; UGAWA, Shinya; KATO, Mai; YOSHIKAWA, Yuto; MIYOSHI, Noriyuki; TANABE, Kenichi. Prebiotic effect of fructo-oligosaccharides on the inner ear of DBA/2 J mice with early-onset progressive hearing loss. **Journal of Nutritional Biochemistry**, vol. 75, no. 19, p. 108247, 2020. DOI 10.1016/j.jnutbio.2019.108247. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2019.108247>.

KOUTELIDAKIS, Ioannis; PAPAZIOGAS, Basilios; GIAMARELLOS-BOURBOULIS, Evangelos J.; MAKRIS, John; PAVLIDIS, Theodoros; GIAMARELLOU, Helen; PAPAZIOGAS, Thomas. Systemic endotoxaemia following obstructive jaundice: The role of lactulose. **Journal of Surgical Research**, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0022-4804\(03\)00209-9](https://doi.org/10.1016/S0022-4804(03)00209-9).

KOUTINAS, Athanasios A.; PAPAPOSTOLOU, Harris; DIMITRELLOU, Dimitra; KOPSAHELIS, Nikolaos; KATECHAKI, Eleftheria; BEKATOROU, Argyro; BOSNEA, Loulouda A. Whey valorisation: A complete and novel technology development for dairy industry starter culture production. **Bioresource Technology**, vol. 100, no. 15, p. 3734–3739, 2009. DOI 10.1016/j.biortech.2009.01.058. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2009.01.058>.

KURAKAKE, Masahiro; MASUMOTO, R. Y.O.; MAGUMA, Kunihiro; KAMATA, Akiko; SAITO, Etsuko; UKITA, Norihiro; KOMAKI, Toshiaki. Production of fructooligosaccharides by  $\beta$ -fructofuranosidases from *Aspergillus oryzae* KB. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2010. <https://doi.org/10.1021/jf903303w>.

KURIYAMA, Shigenobu; MENDEL, Lafayette B. the Physiological Behavior of Raffinose. **Journal of Biological Chemistry**, vol. 31, no. 1, p. 125–147, 1917. DOI 10.1016/s0021-9258(18)86716-3. Available at: [http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)86716-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9258(18)86716-3).

LEE, Y. J.; KIM, C. S.; OH, D. K. Lactulose production by  $\beta$ -galactosidase in permeabilized cells of *Kluyveromyces lactis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, vol. 64, no. 6, p. 787–793, 2004. <https://doi.org/10.1007/s00253-003-1506-1>.

LI, Pei jun; XIA, Jin lan; NIE, Zhen yuan; SHAN, Yang. Pectic oligosaccharides hydrolyzed from orange peel by fungal multi-enzyme complexes and their prebiotic and antibacterial potentials. **LWT - Food Science and Technology**, vol. 69, p. 203–210, 2016. DOI 10.1016/j.lwt.2016.01.042. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2016.01.042>.

LI, Wei; WANG, Keqi; SUN, Yi; YE, Hong; HU, Bing; ZENG, Xiaoxiong. Lactosucrose and its analogues derived from lactose and sucrose: Influence of structure on human intestinal microbiota in vitro. **Journal of Functional Foods**, vol. 17, p. 73–82, 2015. DOI 10.1016/j.jff.2015.05.015. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2015.05.015>.

LIAO, W.; FLOREN, C. H. Current understanding of endotoxin activation of macrophages, endotoxic shock and endotoxin-induced hyperlipidemia. **EOS Rivista di Immunologia ed Immunofarmacologia**, 1994. .

LIAO, Wei; FLORÉN, Claes Henrik. Endotoxin, cytokines, and hyperlipidemia. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, 1993. <https://doi.org/10.3109/00365529309096053>.

LIESE, Andreas; HILTERHAUS, Lutz. Evaluation of immobilized enzymes for industrial applications. **Chemical Society Reviews**, vol. 42, no. 15, p. 6236–6249, Aug. 2013. <https://doi.org/10.1039/c3cs35511j>.

LIMA, ARIOSVANA FERNANDES. **IMOBILIZAÇÃO DE UMA  $\beta$ -GALACTOSIDASE PRODUZIDA POR *Kluyveromyces lactis* NRRL Y-1564 CULTIVADA EM SORO DE LEITE**. 2012. 101 f. Universidade Federal do Ceará, 2012.

LIMA, Ariosvana Fernandes; CAVALCANTE, Kenia Franco; DE FREITAS, Maria De Fátima Matos; RODRIGUES, Tigressa Helena Soares; ROCHA, Maria Valderez Ponte; GONÇALVES, Luciana Rocha Barros. Comparative biochemical characterization of soluble and chitosan immobilized  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* NRRL Y1564. **Process Biochemistry**, vol. 48, no. 3, p. 443–452, 2013. DOI 10.1016/j.procbio.2013.02.002. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2013.02.002>.

LIONG, Min Tze. Roles of probiotics and prebiotics in colon cancer prevention: Postulated mechanisms and in-vivo evidence. **International Journal of Molecular Sciences**, 2008. <https://doi.org/10.3390/ijms9050854>.

LO, Summie; DUGDALE, Megan L.; JEERH, Nisha; KU, Tabitha; ROTH, Nathan J.; HUBER, Reuben E. Studies of Glu-416 variants of  $\beta$ -galactosidase (*E. coli*) Show that the active site  $Mg^{2+}$  is not important for structure and indicate that the main role of  $Mg^{2+}$  is to mediate optimization of active site chemistry. **Protein Journal**, vol. 29, no. 1, p. 26–31, 2010. <https://doi.org/10.1007/s10930-009-9216-x>.

MA, Yan; WU, Xingzhuang; GIOVANNI, Vigna; MENG, Xianjun. Effects of soybean oligosaccharides on intestinal microbial communities and immune modulation in mice. **Saudi Journal of Biological Sciences**, vol. 24, no. 1, p. 114–121, 2017. DOI 10.1016/j.sjbs.2016.09.004. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.sjbs.2016.09.004>.

MACK, D R; FLICK, J A; DURIE, P R; ROSENSTEIN, B J; ELLIS, L E; PERMAN, J A. INTESTINAL LACTULOSE PERMEABILITY REFLECTS EXOCRINE PANCREATIC DYSFUNCTION. **Pediatric Research**, 1990. <https://doi.org/10.1203/00006450-199005000-00093>.

MACK, David R.; FLICK, Jonathan A.; DURIE, Peter R.; ROSENSTEIN, Beryl J.; ELLIS, Lynda E.; PERMAN, Jay A. Correlation of intestinal lactulose permeability with exocrine pancreatic dysfunction. **The Journal of Pediatrics**, 1992. [https://doi.org/10.1016/S0022-3476\(05\)80230-6](https://doi.org/10.1016/S0022-3476(05)80230-6).

MANTOVANI, José R.; CARRERA, Marciza; LANDGRAF, Paulo R. C.; MIRANDA, José M. Soro ácido de leite como fonte de nutrientes para o milho. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, vol. 19, no. 4, p. 324–329, 2015. <https://doi.org/10.1590/1807-1929/agriambi.v19n4p324-329>.

MARTÍNEZ-VILLALUENGA, Cristina; CARDELLE-COBAS, Alejandra; CORZO, Nieves; OLANO, Agustín; VILLAMIEL, Mar. Optimization of conditions for galactooligosaccharide synthesis during lactose hydrolysis by  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* (Lactozym 3000 L HP G). **Food Chemistry**, vol. 107, no. 1, p. 258–264, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.08.011>.

MARTÍNEZ-VILLALUENGA, Cristina; FRÍAS, Juana; VIDAL-VALVERDE, Concepción. Raffinose family oligosaccharides and sucrose contents in 13 Spanish lupin cultivars. **Food Chemistry**, vol. 91, no. 4, p. 645–649, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.06.034>.

MATEO, Cesar; ABIAN, Olga; BERNEDO, Marieta; CUENCA, Emma; FUENTES, Manuel; FERNANDEZ-LORENTE, Gloria; PALOMO, Jose M.; GRAZU, Valeria; PESSELA, Benevides C.C.; GIACOMINI, Cecilia; IRAZOQUI, Gabriela; VILLARINO, Andrea; OVSEJEVI, Karen; BATISTA-VIERA, Francisco; FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto; GUISÁN, Jose M. Some special features of glyoxyl supports to immobilize proteins. **Enzyme and Microbial Technology**, vol. 37, no. 4, p. 456–462, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.03.020>.

MATEO, Cesar; PALOMO, Jose M.; FERNANDEZ-LORENTE, Gloria; GUISAN, Jose M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme and Microbial Technology**, vol. 40, no. 6, p. 1451–1463, May 2007. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2007.01.018>.

MATEO, César; PALOMO, José M.; FUENTES, Manuel; BETANCOR, Lorena; GRAZU, Valeria; LÓPEZ-GALLEGO, Fernando; PESSELA, Benevides C.C.; HIDALGO, Aurélio; FERNÁNDEZ-LORENTE, Gloria; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, Roberto; GUISÁN, José M. Glyoxyl agarose: A fully inert and hydrophilic support for immobilization and high stabilization of proteins. **Enzyme and Microbial Technology**, vol. 39, no. 2, p. 274–280, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.10.014>.

MAYER, Jürgen; CONRAD, Jürgen; KLAIBER, Iris; LUTZ-WAHL, Sabine; BEIFUSS, Uwe; FISCHER, Lutz. Enzymatic production and complete nuclear magnetic resonance assignment of the sugar lactulose. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, vol. 52, no. 23, p. 6983–6990, 2004. <https://doi.org/10.1021/jf048912y>.

MCDONOUGH, F. E.; HARGROVE, R. E.; MATTINGLY, W. A.; POSATI, L. P.; ALFORD, J. A. Composition and Properties of Whey Protein Concentrates from Ultrafiltration. **Journal of Dairy Science**, 1974. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(74\)85086-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(74)85086-1).

MENDICINO, Joseph F. Effect of Borate on the Alkali-catalyzed Isomerization of Sugars. **Journal of the American Chemical Society**, vol. 82, no. 18, p. 4975–4979, 1960. <https://doi.org/10.1021/ja01503a055>.

MIRABELLA, Nadia; CASTELLANI, Valentina; SALA, Serenella. Current options for the valorization of food manufacturing waste: A review. **Journal of Cleaner Production**, vol. 65, p. 28–41, 2014. DOI 10.1016/j.jclepro.2013.10.051. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jclepro.2013.10.051>.

MOHANTY, Debapriya; MISRA, Snigdha; MOHAPATRA, Swati; SAHU, Priyadarshi Soumyaranjan. Prebiotics and synbiotics: Recent concepts in nutrition. **Food Bioscience**, vol. 26, no. November 2017, p. 152–160, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2018.10.008>.

MONIER, M.; YOUSSEF, I.; ABDEL-LATIF, D. A. Synthesis of photo-responsive chitosan-cinnamate for efficient entrapment of  $\beta$ -galactosidase enzyme. **Reactive and Functional Polymers**, vol. 124, no. January, p. 129–138, 2018. DOI 10.1016/j.reactfunctpolym.2018.01.012. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2018.01.012>.

MONSAN, P. Optimization of glutaraldehyde activation of a support for enzyme immobilization. **Journal of Molecular Catalysis**, vol. 3, no. 5, p. 371–384, 1978. [https://doi.org/10.1016/0304-5102\(78\)80026-1](https://doi.org/10.1016/0304-5102(78)80026-1).

MÖRSCHBÄCHER, Ana Paula; VOLPATO, Giandra; SOUZA, Claucia Fernanda Volken de. Kluyveromyces lactis  $\beta$ -galactosidase immobilization in calcium alginate spheres and gelatin for hydrolysis of cheese whey lactose. **Ciência Rural**, vol. 46, no. 5, p. 921–926, 2016. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20150833>.

MORTON, S.; PENCHEON, D.; BICKLER, G. The sustainable development goals provide an important framework for addressing dangerous climate change and achieving wider public health benefits. **Public Health**, vol. 174, p. 65–68, 2019. DOI 10.1016/j.puhe.2019.05.018. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.puhe.2019.05.018>.

MURARI, Cleidiane Samara; MACHADO, Whallans Raphael Couto; SCHUINA, Guilherme Lorencini; DEL BIANCHI, Vanildo Luiz. Optimization of bioethanol production from cheese whey using Kluyveromyces marxianus URM 7404. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, vol. 20, no. December 2018, p. 101182, 2019. DOI 10.1016/j.bcab.2019.101182. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101182>.

MUSSATTO, Solange I.; MANCILHA, Ismael M. Non-digestible oligosaccharides: A review. **Carbohydrate Polymers**, vol. 68, no. 3, p. 587–597, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2006.12.011>.

NAWAWI, Noor Namirah; HASHIM, Zanariah; RAHMAN, Roshanida A.; MURAD, Abdul Munir Abdul; BAKAR, Farah Diba Abu; ILLIAS, Rosli Md. Entrapment of porous cross-linked enzyme aggregates of maltogenic amylase from Bacillus lehensis G1 into calcium alginate for maltooligosaccharides synthesis. **International Journal of Biological Macromolecules**, vol. 150, p. 80–89, 2020. DOI 10.1016/j.ijbiomac.2020.02.032. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.02.032>.

NEIFAR, Sawssan; CERVANTES, Fadia V.; BOUANANE-DARENFED, Amel; BENHLIMA, Hajer; BALLESTEROS, Antonio O.; PLOU, Francisco J.; BEJAR, Samir. Immobilization of the glucose isomerase from Caldicoprobacter algeriensis on Sepabeads EC-HA and its efficient application in continuous High Fructose Syrup production using packed bed reactor. **Food Chemistry**, vol. 309, no. June 2019, p. 125710, 2020. DOI 10.1016/j.foodchem.2019.125710. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125710>.

NETO, Carlos Alberto Chaves Girão; SILVA, Natan Câmara Gomes e.; DE OLIVEIRA COSTA, Thaís; DE ALBUQUERQUE, Tiago Lima; GONÇALVES, Luciana Rocha Barros; FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto; ROCHA, Maria Valderez Ponte. The  $\beta$ -galactosidase immobilization protocol determines its performance as catalysts in the kinetically controlled synthesis of lactulose. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.02.078>.

NGUYEN, Vuong D.; STYEVKÓ, Gabriella; MADARAS, Erzsébet; HAKTANIRLAR, Gökce; TRAN, Anh T.M.; BUJNA, Erika; DAM, Mai S.; NGUYEN, Quang D. Immobilization of  $\beta$ -galactosidase on chitosan-coated magnetic nanoparticles and its application for synthesis of lactulose-based galactooligosaccharides. **Process Biochemistry**, vol. 84, no. April, p. 30–38, 2019. DOI 10.1016/j.procbio.2019.05.021. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.05.021>.

NGUYEN, Vuong D.; STYEVKÓ, Gabriella; TA, Linh P.; TRAN, Anh T.M.; BUJNA, Erika; ORBÁN, Petra; DAM, Mai S.; NGUYEN, Quang D. Immobilization and some properties of commercial enzyme preparation for production of lactulose-based oligosaccharides. **Food and Bioproducts Processing**, vol. 107, p. 97–103, 2018. DOI 10.1016/j.fbp.2017.11.004. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fbp.2017.11.004>.

NICHELE, Valentina; SIGNORETTO, Michela; GHEDINI, Elena.  $\beta$ -Galactosidase entrapment in silica gel matrices for a more effective treatment of lactose intolerance. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, vol. 71, no. 1–2, p. 10–15, 2011. DOI 10.1016/j.molcatb.2011.03.002. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcatb.2011.03.002>.

NOOSHKAM, Majid; BABAZADEH, Afshin; JOOYANDEH, Hossein. Lactulose: Properties, techno-functional food applications, and food grade delivery system. **Trends in Food Science and Technology**, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.07.028>.

OLIVEIRA, Débora F. de; BRAVO, Claudia E. C.; TONIAL, Ivane B. Artigo de Revisão SORO DE LEITE : UM SUBPRODUTO VALIOSO. **Rev. Inst. Latic. “Cândido Tostes,”** vol. 67, no. 385, p. 64–71, 2012. <https://doi.org/10.5935/2238-6416.20120025>.

ORNELAS, A. P.; SILVEIRA, W. B.; SAMPAIO, F. C.; PASSOS, F. M.L. The activity of  $\beta$ -galactosidase and lactose metabolism in *Kluyveromyces lactis* cultured in cheese whey as a function of growth rate. **Journal of Applied Microbiology**, 2008. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03622.x>.

OTIENO, Daniel Obed. Synthesis of  $\beta$ -Galactooligosaccharides from Lactose Using Microbial  $\beta$ -Galactosidases. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, vol. 9, no. 5, p. 471–482, 2010. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2010.00121.x>.

PADILLA, Beatriz; FRAU, Florencia; RUIZ-MATUTE, Ana Isabel; MONTILLA, Antonia; BELLOCH, Carmela; MANZANARES, Paloma; CORZO, Nieves. Production of lactulose oligosaccharides by isomerisation of transgalactosylated cheese whey permeate obtained by  $\beta$ -galactosidases from dairy *Kluyveromyces*. **Journal of Dairy Research**, vol. 82, no. 3, p. 356–364, 2015. <https://doi.org/10.1017/S0022029915000217>.

PANESAR, P. S.; BALI, V. Prebiotics. **Encyclopedia of Food and Health**, vol. 18, no. 2, p. 464–471, 2015. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00560-2>.

PANESAR, Parmjit S.; KENNEDY, John F.; GANDHI, Dina N.; BUNKO, Katarzyna. Bioutilisation of whey for lactic acid production. **Food Chemistry**, vol. 105, no. 1, p. 1–14, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.03.035>.

PANESAR, Parmjit S.; KUMARI, Shweta. Lactulose: Production, purification and potential applications. **Biotechnology Advances**, vol. 29, no. 6, p. 940–948, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.08.008>.

PANESAR, Parmjit S.; KUMARI, Shweta; PANESAR, Reeba. Potential applications of immobilized  $\beta$ -galactosidase in food processing industries. **Enzyme Research**, vol. 2010, 2010. <https://doi.org/10.4061/2010/473137>.

PAPAYANNAKOS, N.; MARKAS, G.; KEKOS, D. Studies on modelling and simulation of lactose hydrolysis by free and immobilized  $\beta$ -galactosidase from *Aspergillus niger*. **The Chemical Engineering Journal**, vol. 52, no. 1, 1993. [https://doi.org/10.1016/0300-9467\(93\)80044-O](https://doi.org/10.1016/0300-9467(93)80044-O).

PARK, Y. K.; ALMEIDA, M. M. Production of fructooligosaccharides from sucrose by a transfructosylase from *Aspergillus niger*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, 1991. <https://doi.org/10.1007/BF00329399>.

PATEL, Seema; GOYAL, Arun. Functional oligosaccharides: Production, properties and applications. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 2011. <https://doi.org/10.1007/s11274-010-0558-5>.

PDB, RCSB. STRUCTURE OF BETA-GALACTOSIDASE FROM ASPERGILLUS NIGER. [s. d.]. Available at: <https://www.rcsb.org/structure/5IFP>. Accessed on: 20 Apr. 2020a.

PDB, RCSB. Structure of the beta-galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. [s. d.]. Available at: <https://www.rcsb.org/structure/3OBA>. Accessed on: 20 Apr. 2020b.

PEREIRA-RODRÍGUEZ, Ángel; FERNÁNDEZ-LEIRO, Rafael; GONZÁLEZ-SISO, M. Isabel; CERDÁN, M. Esperanza; BECERRA, Manuel; SANZ-APARICIO, Julia. Structural basis of specificity in tetrameric *Kluyveromyces lactis*  $\beta$ -galactosidase. **Journal of Structural Biology**, vol. 177, no. 2, p. 392–401, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2011.11.031>.

PEREIRA-RODRÍGUEZ, Ángel; FERNÁNDEZ-LEIRO, Rafael; GONZÁLEZ SISO, M. Isabel; CERDÁN, M. Esperanza; BECERRA, Manuel; SANZ-APARICIO, Julia. Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of B-galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. **Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications**, vol. 66, no. 3, p. 297–300, 2010. <https://doi.org/10.1107/S1744309109054931>.

PESSELA, Benevides C.C.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, Roberto; FUENTES, Manuel; VIÁN, Alejandro; GARCÍA, José L.; CARRASCOSA, Alfonso V.; MATEO, César; GUISÁN, José M. Reversible immobilization of a thermophilic  $\beta$ -galactosidase via ionic adsorption on PEI-coated Sepabeads. **Enzyme and Microbial Technology**, vol. 32, no. 3–4, p. 369–374, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(02\)00307-1](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(02)00307-1).

PETERBAUER, Thomas; MUCHA, Jan; MACH, Lukas; RICHTER, Andreas. Chain elongation of raffinose in pea seeds. Isolation, characterization, and molecular cloning of a multifunctional enzyme catalyzing the synthesis of stachyose and verbascose. **Journal of Biological Chemistry**, vol. 277, no. 1, p. 194–200, 2002. DOI 10.1074/jbc.M109734200. Available at: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M109734200>.

PINHEIRO ALVES, Maura; DE OLIVEIRA MOREIRA, Renam; HENRIQUE RODRIGUES JÚNIOR, Paulo; CARLA DE FREITAS MARTINS, Mayra; TULER PERRONE, Ítalo; FERNANDES DE CARVALHO, Antônio. Soro De Leite: Tecnologias Para O Processamento De Coprodutos. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, vol. 69, no. 3, p. 212, 2014. <https://doi.org/10.14295/2238-6416.v69i3.341>.

PRAZERES, Ana R.; CARVALHO, Fátima; RIVAS, Javier. Cheese whey management: A review. **Journal of Environmental Management**, vol. 110, p. 48–68, 2012. DOI 10.1016/j.jenvman.2012.05.018. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jenvman.2012.05.018>.

QUAX, Wim J. Thermostable glucose isomerases. **Trends in Food Science and Technology**, vol. 4, no. 2, p. 31–34, 1993. [https://doi.org/10.1016/0924-2244\(93\)90056-G](https://doi.org/10.1016/0924-2244(93)90056-G).

QUIGLEY, Eamonn M.M. Prebiotics and Probiotics in Digestive Health. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, vol. 17, no. 2, p. 333–344, 2019. DOI 10.1016/j.cgh.2018.09.028. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2018.09.028>.

RAJESHWARI, K. V.; BALAKRISHNAN, M.; KANSAL, A.; LATA, Kusum; KISHORE, V. V.N. State-of-the-art of anaerobic digestion technology for industrial wastewater treatment. **Renewable & sustainable energy reviews**, vol. 4, no. 2, p. 135–156, 2000. [https://doi.org/10.1016/S1364-0321\(99\)00014-3](https://doi.org/10.1016/S1364-0321(99)00014-3).

RAMOS, O. L.; PEREIRA, R. N.; RODRIGUES, R. M.; TEIXEIRA, J. A.; VICENTE, A. A.; MALCATA, F. X. **Whey and Whey Powders: Production and Uses**. 1st ed. [S. l.]: Elsevier Ltd., 2015. DOI 10.1016/B978-0-12-384947-2.00747-9. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00747-9>.

RIBEIRO, T.; CARDOSO, V.; FERREIRA, L. M.A.; LORDELO, M. M.S.; COELHO, E.; MOREIRA, A. S.P.; DOMINGUES, M. R.M.; COIMBRA, M. A.; BEDFORD, M. R.; FONTES, C. M.G.A. Xylo-oligosaccharides display a prebiotic activity when used to supplement wheat or corn-based diets for broilers. **Poultry science**, vol. 97, no. 12, p. 4330–4341, 2018. DOI 10.3382/ps/pey336. Available at: <http://dx.doi.org/10.3382/ps/pey336>.

RICARDI, Natália Carminatti; DE MENEZES, Eliana Weber; VALMIR BENVENUTTI, Edilson; DA NATIVIDADE SCHÖFFER, Jéssie; HACKENHAAR, Camila Regina; HERTZ, Plinho Francisco; COSTA, Tania Maria Haas. Highly stable novel silica/chitosan support for  $\beta$ -galactosidase immobilization for application in dairy technology. **Food Chemistry**, vol. 246, no. November 2017, p. 343–350, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.11.026>.

RICO-RODRÍGUEZ, Fabián; SERRATO, Juan Carlos; MONTILLA, Antonia; VILLAMIEL, Mar. Impact of ultrasound on galactooligosaccharides and gluconic acid production throughout a multienzymatic system. **Ultrasonics Sonochemistry**, vol. 44, p. 177–183, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2018.02.022>.

ROBERFROID, Marcel; GIBSON, Glenn R.; HOYLES, Lesley; MCCARTNEY, Anne L.; RASTALL, Robert; ROWLAND, Ian; WOLVERS, Danielle; WATZL, Bernhard; SZAJEWSKA, Hania; STAHL, Bernd; GUARNER, Francisco; RESPONDEK, Frederique; WHELAN, Kevin; COXAM, Veronique; DAVICCO, Marie Jeanne; LÉOTOING, Laurent; WITTRANT, Yohann; DELZENNE, Nathalie M.; CANI, Patrice D.; ... MEHEUST, Agnes. Prebiotic effects: Metabolic and health benefits. **British Journal of Nutrition**, 2010. <https://doi.org/10.1017/S0007114510003363>.

ROBERFROID, Marcel; SLAVIN, Joanne. Nondigestible Oligosaccharides. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 2000. <https://doi.org/10.1080/10408690091189239>.

RODRIGUEZ-COLINAS, Barbara; FERNANDEZ-ARROJO, Lucia; BALLESTEROS, Antonio O.; PLOU, Francisco J. Galactooligosaccharides formation during enzymatic hydrolysis of lactose: Towards a prebiotic-enriched milk. **Food Chemistry**, vol. 145, p. 388–394, 2014. DOI 10.1016/j.foodchem.2013.08.060. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.08.060>.

RODRÍGUEZ, Ángel Pereira; LEIRO, Rafael Fernández; CERDÁN, M. Esperanza; GONZÁLEZ SISO, M. Isabel; FERNÁNDEZ, Manuel Becerra. Kluyveromyces lactis  $\beta$ -galactosidase crystallization using full-factorial experimental design. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, vol. 52–53, no. 1–4, p. 178–182, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2007.11.013>.

RODRÍGUEZ, Ángel Pereira; LEIRO, Rafael Fernández; CRISTINA, M. Cristina; CERDÁN, M. Esperanza; GONZÁLEZ SISO, M. Isabel; BECERRA, Manuel. Secretion and properties of a hybrid Kluyveromyces lactis-Aspergillus niger  $\beta$ -galactosidase. **Microbial Cell Factories**, vol. 5, p. 1–13, 2006. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-5-41>.

ROY, Ipsita; GUPTA, Munishwar N. Lactose hydrolysis by Lactozym<sup>TM</sup> immobilized on cellulose beads in batch and fluidized bed modes. **Process Biochemistry**, vol. 39, no. 3, p. 325–332, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(03\)00086-4](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(03)00086-4).

RUEDA, Nazzoly; DOS SANTOS, Jose C.S.; ORTIZ, Claudia; TORRES, Rodrigo; BARBOSA, Oveimar; RODRIGUES, Rafael C.; BERENGUER-MURCIA, Ángel; FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto. Chemical Modification in the Design of Immobilized Enzyme Biocatalysts: Drawbacks and Opportunities. **Chemical Record**, vol. 16, no. 3, p. 1436–1455, Jun. 2016. <https://doi.org/10.1002/tcr.201600007>.

RYCROFT, C.E.; JONES, M.R.; GIBSON, G.R.; RASTALL, R.A. A comparative in vitro evaluation of the fermentation properties of prebiotic oligosaccharides. **Journal of Applied Microbiology**, vol. 91, no. 5, p. 878–887, 23 Nov. 2001. DOI 10.1046/j.1365-2672.2001.01446.x. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-2672.2001.01446.x>.

SAKO, Tomoyuki; MATSUMOTO, Keisuke; TANAKA, Ryuichiro. Recent progress on research and applications of non-digestible galacto-oligosaccharides. **International Dairy Journal**, vol. 9, no. 1, p. 69–80, 1999. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(99\)00046-1](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(99)00046-1).

SAWALE, Pravin D.; SHENDURSE, Ashish M.; MOHAN, Maneesha S.; PATIL, G. R. Isomaltulose (Palatinose) – An emerging carbohydrate. **Food Bioscience**, vol. 18, no. November 2016, p. 46–52, 2017. DOI 10.1016/j.fbio.2017.04.003. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fbio.2017.04.003>.

SCHMIDT, Christian M.; BALINGER, Franziska; CONRAD, Jürgen; GÜNTHER, Johannes; BEIFUSS, Uwe; HINRICHS, Jörg. Enzymatic generation of lactulose in sweet and acid whey: Optimization of feed composition and structural elucidation of 1-lactulose. **Food Chemistry**, vol. 305, no. May 2019, p. 125481, 2020. DOI 10.1016/j.foodchem.2019.125481. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125481>.

SCHMIDT, Christian M.; NEDELE, Ann Kathrin; HINRICHS, Jörg. Enzymatic generation of lactulose in sweet and acid whey: Feasibility study for the scale up towards robust processing. **Food and Bioproducts Processing**, vol. 119, p. 329–336, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2019.11.015>.

SCHUMANN, Christian. Medical, nutritional and technological properties of lactulose. An update. **European Journal of Nutrition**, vol. 41, no. SUPPL. 1, p. 17–25, 2002. <https://doi.org/10.1007/s00394-002-1103-6>.

SCHUSTER-WOLFF-BÜHRING, R.; FISCHER, L.; HINRICHS, J. Production and physiological action of the disaccharide lactulose. **International Dairy Journal**, vol. 20, no. 11, p. 731–741, 2010. DOI 10.1016/j.idairyj.2010.05.004. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.idairyj.2010.05.004>.

SEYHAN TÜKEL, S.; ALAGÖZ, Dilek. Catalytic efficiency of immobilized glucose isomerase in isomerization of glucose to fructose. **Food Chemistry**, vol. 111, no. 3, p. 658–662, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.04.035>.

SHAHIDI, F. Functional Foods: Their Role in Health Promotion and Disease Prevention. **Journal of Food Science**, 2006. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2004.tb10727.x>.

SHEN, Qiuyun; YANG, Ruijin; HUA, Xiao; YE, Fayin; WANG, He; ZHAO, Wei; WANG, Kun. Enzymatic synthesis and identification of oligosaccharides obtained by transgalactosylation of lactose in the presence of fructose using  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. **Food Chemistry**, vol. 135, no. 3, p. 1547–1554, 2012. DOI 10.1016/j.foodchem.2012.05.115. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.05.115>.

SHYAM, Sangeetha; RAMADAS, Amutha; CHANG, Sui Kiat. Isomaltulose: Recent evidence for health benefits. **Journal of Functional Foods**, vol. 48, no. May, p. 173–178, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.07.002>.

SITANGGANG, Azis Boing; DREWS, Anja; KRAUME, Matthias. Continuous synthesis of lactulose in an enzymatic membrane reactor reduces lactulose secondary hydrolysis. **Bioresource Technology**, 2014a. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.05.124>.

SITANGGANG, Azis Boing; DREWS, Anja; KRAUME, Matthias. Rapid transgalactosylation towards lactulose synthesis in a small-scale enzymatic membrane reactor (EMR). **Chemical Engineering Transactions**, 2014b. <https://doi.org/10.3303/CET1438004>.

SONG, Yoon Seok; LEE, Hee Uk; PARK, Chulhwan; KIM, Seung Wook. Batch and continuous synthesis of lactulose from whey lactose by immobilized  $\beta$ -galactosidase. **Food Chemistry**, vol. 136, no. 2, p. 689–694, 2013a. DOI 10.1016/j.foodchem.2012.08.074. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.08.074>.

SONG, Yoon Seok; LEE, Hee Uk; PARK, Chulhwan; KIM, Seung Wook. Optimization of lactulose synthesis from whey lactose by immobilized  $\beta$ -galactosidase and glucose isomerase. **Carbohydrate Research**, vol. 369, p. 1–5, 2013b. DOI 10.1016/j.carres.2013.01.002. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carres.2013.01.002>.

SØRENSEN, Mette; PENN, Michael; EL-MOWAFI, Adel; STOREBAKKEN, Trond; CHUNFANG, Cai; ØVERLAND, Margareth; KROGDAHL, Åshild. Effect of stachyose, raffinose and soya-saponins supplementation on nutrient digestibility, digestive enzymes, gut morphology and growth performance in Atlantic salmon (*Salmo salar*, L.). **Aquaculture**, vol. 314, no. 1–4, p. 145–152, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.02.013>.

SOTO, Dayana; ESCOBAR, Sindy; GUZMÁN, Fanny; CÁRDENAS, Constanza; BERNAL, Claudia; MESA, Monica. Structure-activity relationships on the study of  $\beta$ -galactosidase folding/unfolding due to interactions with immobilization additives: Triton X-100 and ethanol. **International Journal of Biological Macromolecules**, vol. 96, p. 87–92, 2017. DOI 10.1016/j.ijbiomac.2016.12.026. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.12.026>.

SOUZA, Clitor J.F.; GARCIA-ROJAS, Edwin E.; FAVARO-TRINDADE, Carmen S. Lactase ( $\beta$ -galactosidase) immobilization by complex formation: Impact of biopolymers on enzyme activity. **Food Hydrocolloids**, vol. 83, p. 88–96, 2018. DOI 10.1016/j.foodhyd.2018.04.044. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.04.044>.

SPOHNER, Sebastian C.; SCHAUM, Vivienne; QUITMANN, Hendrich; CZERMAK, Peter. Kluyveromyces lactis: An emerging tool in biotechnology. **Journal of Biotechnology**, vol. 222, p. 104–116, 2016. DOI 10.1016/j.jbiotec.2016.02.023. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.02.023>.

SRIDEVI, V; SUMATHI, V; GURU PRASAD, M; SATISH KUMAR, M. Fructooligosaccharides - type prebiotic: a review. **Journal of Pharmacy Research**, 2014. .

SUÁREZ, Sebastián; GUERRERO, Cecilia; VERA, Carlos; ILLANES, Andrés. Effect of particle size and enzyme load on the simultaneous reactions of lactose hydrolysis and transgalactosylation with glyoxyl-agarose immobilized  $\beta$ -galactosidase from *Aspergillus oryzae*. **Process Biochemistry**, vol. 73, no. July, p. 56–64, 2018. DOI 10.1016/j.procbio.2018.08.016. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.08.016>.

TABATABAIE, F; MORTAZAVI, A. Influence of lactulose on the survival of Probiotic strains in yoghurt. **World Applied Sciences Journal**, 2008. .

TABATABAIE, Tahereh; KOTAKE, Yashige; WALLIS, Gemma; JACOB, Jane M.; FLOYD, Robert A. Spin trapping agent phenyl N-tert-butyl nitron protects against the onset of drug-induced insulin-dependent diabetes mellitus. **FEBS Letters**, 1997. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(97\)00327-X](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(97)00327-X).

TAKAHASHI, Natsuko; OKADA, Hideki; FUKUSHI, Eri; ONODERA, Shuichi; NISHIMOTO, Tomoyuki; KAWABATA, Jun; SHIOMI, Norio. Structural analysis of six novel oligosaccharides synthesized by glucosyl transfer from  $\beta$ -d-glucose 1-phosphate to raffinose and stachyose using *Thermoanaerobacter brockii* kojibiose phosphorylase. **Tetrahedron Asymmetry**, vol. 16, no. 1, p. 57–63, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.tetasy.2004.11.026>.

TIZCHANG, Samira; KHIABANI, Mahmood Sowti; MOKARRAM, Reza Rezaei; HAMISHEHKAR, Hamed. Bacterial cellulose nano crystal as hydrocolloid matrix in immobilized  $\beta$ -galactosidase onto silicon dioxide nanoparticles. **LWT**, vol. 123, no. January, p. 109091, 2020. DOI 10.1016/j.lwt.2020.109091. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109091>.

TORRES-SALAS, Pamela; DEL MONTE-MARTINEZ, Alberto; CUTIÑO-AVILA, Bessy; RODRIGUEZ-COLINAS, Barbara; ALCALDE, Miguel; BALLESTEROS, Antonio O.; PLOU, Francisco J. Immobilized biocatalysts: Novel approaches and tools for binding enzymes to supports. **Advanced Materials**, vol. 23, no. 44, p. 5275–5282, 2011. <https://doi.org/10.1002/adma.201101821>.

TORRES, Duarte P.M.; GONÇALVES, Maria do Pilar F.; TEIXEIRA, José A.; RODRIGUES, Lúcia R. Galacto-Oligosaccharides: Production, properties, applications, and significance as prebiotics. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, 2010. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2010.00119.x>.

UÇKUN KIRAN, Esra; TRZCINSKI, Antoine P.; NG, Wun Jern; LIU, Yu. Bioconversion of food waste to energy: A review. **Fuel**, vol. 134, p. 389–399, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2014.05.074>.

URRUTIA, P; MATEO, C; GUISAN, J M; WILSON, L; ILLANES, A. Immobilization of *Bacillus circulans*  $\beta$ -galactosidase and its application in the synthesis of galacto-oligosaccharides under repeated-batch operation. **Biochemical Engineering Journal**, vol. 77, p. 41–48, 2013. DOI 10.1016/j.bej.2013.04.015. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2013.04.015>.

URRUTIA, Paulina; BERNAL, Claudia; WILSON, Lorena; ILLANES, Andrés. Use of chitosan heterofunctionality for enzyme immobilization:  $\beta$ -galactosidase immobilization for galacto-oligosaccharide synthesis. **International Journal of Biological Macromolecules**, vol. 116, p. 182–193, 2018. DOI 10.1016/j.ijbiomac.2018.04.112. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.04.112>.

VAMVAKAKI, Afroditi Nectaria; KANDARAKIS, Ioannis; KAMINARIDES, Stelios; KOMAITIS, Michael; PAPANIKOLAOU, Seraphim. Cheese whey as a renewable substrate for microbial lipid and biomass production by Zygomycetes. **Engineering in Life Sciences**, vol. 10, no. 4, p. 348–360, 2010. <https://doi.org/10.1002/elsc.201000063>.

VERA, Carlos; GUERRERO, Cecilia; ABURTO, Carla; CORDOVA, Andrés; ILLANES, Andrés. Conventional and non-conventional applications of  $\beta$ -galactosidases. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, vol. 1868, no. 1, p. 140271, 2020. DOI 10.1016/j.bbapap.2019.140271. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2019.140271>.

VERA, Carlos; GUERRERO, Cecilia; CONEJEROS, Raúl; ILLANES, Andrés. Synthesis of galacto-oligosaccharides by  $\beta$ -galactosidase from *Aspergillus oryzae* using partially dissolved and supersaturated solution of lactose. **Enzyme and Microbial Technology**, vol. 50, no. 3, p. 188–194, 2012. DOI 10.1016/j.enzmictec.2011.12.003. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.enzmictec.2011.12.003>.

VERA, Carlos; GUERRERO, Cecilia; ILLANES, Andrés. Determination of the transgalactosylation activity of *Aspergillus oryzae*  $\beta$ -galactosidase: Effect of pH, temperature, and galactose and glucose concentrations. **Carbohydrate Research**, vol. 346, no. 6, p. 745–752, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2011.01.030>.

VERA, Carlos; GUERRERO, Cecilia; ILLANES, Andrés; CONEJEROS, Raúl. A pseudo steady-state model for galacto-oligosaccharides synthesis with  $\beta$ -galactosidase from *Aspergillus oryzae*. **Biotechnology and Bioengineering**, vol. 108, no. 10, p. 2270–2279, 2011. <https://doi.org/10.1002/bit.23201>.

VERA, Carlos; ILLANES, Andrés. **Lactose-derived nondigestible oligosaccharides and other high added-value products**. [S. l.]: Elsevier Inc., 2016. DOI 10.1016/B978-0-12-802724-0.00003-2. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-802724-0.00003-2>.

VERMA, Madan Lal; BARROW, Colin James; KENNEDY, J. F.; PURI, Munish. Immobilization of  $\beta$ -d-galactosidase from *Kluyveromyces lactis* on functionalized silicon dioxide nanoparticles: Characterization and lactose hydrolysis. **International Journal of Biological Macromolecules**, vol. 50, no. 2, p. 432–437, 2012. DOI 10.1016/j.ijbiomac.2011.12.029. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2011.12.029>.

VORAGEN, Alphons G.J. Technological aspects of functional food-related carbohydrates. **Trends in Food Science and Technology**, vol. 9, no. 8–9, p. 328–335, 1998. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(98\)00059-4](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(98)00059-4).

WAHBA, Marwa I. Chitosan-glutaraldehyde activated calcium pectinate beads as a covalent immobilization support. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, vol. 12, no. October, p. 266–274, 2017. DOI 10.1016/j.bcab.2017.10.016. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcab.2017.10.016>.

WANG, He; YANG, Ruijin; HUA, Xiao; ZHAO, Wei; ZHANG, Wenbin. Enzymatic production of lactulose and 1-lactulose: Current state and perspectives. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2013. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-4998-3>.

WANG, Zerong. Lobry de Bruyn-Alberda van Ekenstein Transformation. **Comprehensive Organic Name Reactions and Reagents**. [S. l.: s. n.], 2010. <https://doi.org/10.1002/9780470638859.conrr396>.

WEI, Wei; QI, Danping; DIAO, Mingming; ZHAOXIN, Lu; LV, Fengxia; ZHAO, Haizhen.  $\beta$ -galactosidase-catalyzed synthesis of 3-O- $\beta$ -D-galactopyranosyl-sn-glycerol: Optimization by response surface methodology. **Biocatalysis and Biotransformation**, vol. 34, no. 4, p. 152–160, 2016. DOI 10.1080/10242422.2016.1247815. Available at: <http://dx.doi.org/10.1080/10242422.2016.1247815>.

WEI, Wei; QI, Danping; ZHAO, Hai Zhen; LU, Zhao Xin; LV, Fengxia; BIE, Xiaomei. Synthesis and characterisation of galactosyl glycerol by  $\beta$ -galactosidase catalysed reverse hydrolysis of galactose and glycerol. **Food Chemistry**, vol. 141, no. 3, p. 3085–3092, 2013. DOI 10.1016/j.foodchem.2013.05.145. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.05.145>.

WEIGNEROVÁ, Lenka; BOJAROVÁ, Pavla; KREN, Vladimír. Glycosidases in synthesis. , p. 311–333, 2009. <https://doi.org/10.1039/b901495k>.

WOLLOWSKI, I.; RECHKEMMER, G.; POOL-ZOBEL, B. L. Protective role of probiotics and prebiotics in colon cancer. 2001. **American Journal of Clinical Nutrition** [...]. [S. l.: s. n.], 2001. <https://doi.org/10.1093/ajcn/73.2.451s>.

XAVIER, Janifer Raj; RAMANA, Karna Venkata; SHARMA, Rakesh Kumar.  $\beta$ -galactosidase: Biotechnological applications in food processing. **Journal of Food Biochemistry**, vol. 42, no. 5, 2018. <https://doi.org/10.1111/jfbc.12564>.

XI, Menglu; ZHAO, Shenglong; GE, Wupeng; CHEN, Ying; CUI, Xiuxiu; SUN, Qiwu. Effects of stachyose on the intestinal microbiota and barrier in antibiotic-treated mice. **Journal of Functional Foods**, vol. 83, no. 22, p. 104493, 2021. DOI 10.1016/j.jff.2021.104493. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2021.104493>.

YANG, Pei; HU, Haibin; LIU, Yang; LI, Yanxian; AI, Qinghui; XU, Wei; ZHANG, Wenbing; ZHANG, Yongan; ZHANG, Yanjiao; MAI, Kangsen. Dietary stachyose altered the intestinal microbiota profile and improved the intestinal mucosal barrier function of juvenile turbot, *Scophthalmus maximus* L. **Aquaculture**, vol. 486, no. November 2017, p. 98–106, 2018. DOI 10.1016/j.aquaculture.2017.12.014. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.12.014>.

YIN, Huifang; BULTEMA, Jelle B.; DIJKHUIZEN, Lubbert; VAN LEEUWEN, Sander S. Reaction kinetics and galactooligosaccharide product profiles of the  $\beta$ -galactosidases from *Bacillus circulans*, *Kluyveromyces lactis* and *Aspergillus oryzae*. **Food Chemistry**, vol. 225, p. 230–238, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.01.030>.

ZHAO, Hong; CUI, Qing; SHAH, Vishva; XU, Jianhong; WANG, Tao. Enhancement of glucose isomerase activity by immobilizing on silica/chitosan hybrid microspheres. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, vol. 126, p. 18–23, Apr. 2016. DOI 10.1016/j.molcatb.2016.01.013. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcatb.2016.01.013>.

ZHAO, Yue Tao; NIU, Shan; HUANG, Lu Bai; WANG, Ji Ming; YIN, Zhao Jun; LI, Qing; LI, Zhong Jun. Synthesis of raffinose family oligosaccharides by regioselective de-O-benzoylation with  $\text{Co}_2(\text{CO})_8/\text{Et}_3\text{SiH}/\text{CO}$  system. **Tetrahedron**, vol. 69, no. 24, p. 5022–5028, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2013.03.094>.

ZHOU, Quinn Z.K.; CHEN, Xiao Dong. Effects of temperature and pH on the catalytic activity of the immobilized  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. **Biochemical Engineering Journal**, vol. 9, no. 1, p. 33–40, 2001. [https://doi.org/10.1016/S1369-703X\(01\)00118-8](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(01)00118-8).

ZHU, Fan; PROSSER, Colin; ZHU, Ying; OTTER, Don; HEMAR, Yacine. Enzymatic formation of galactooligosaccharides in goat milk. **Food Bioscience**, vol. 26, no. September, p. 38–41, 2018. DOI 10.1016/j.fbio.2018.09.005. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2018.09.005>.

ZHU, Xin; LIU, Jizhe; LIU, Haiying; YANG, Guiqin. Soybean oligosaccharide, stachyose, and raffinose in broilers diets: effects on odor compound concentration and microbiota in cecal digesta. **Poultry Science**, vol. 99, no. 7, p. 3532–3539, 2020. DOI 10.1016/j.psj.2020.03.034. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.03.034>.

ZOLNERE, Kristine; CIPROVICA, Inga. The comparison of commercially available  $\beta$ -Galactosidases for dairy industry: Review. **Research for Rural Development**, vol. 1, p. 215–222, 2017. <https://doi.org/10.22616/rrd.23.2017.032>.

ZOTTA, Teresa; SOLIERI, Lisa; IACUMIN, Lucilla; PICOZZI, Claudia; GULLO, Maria. Valorization of cheese whey using microbial fermentations. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2020. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10408-2>.

ZUÑIGA, Abraham Damian Giraldo. **Estratégia De Purificação Das Proteínas A-Lactoalbumina E B-Lactoglobulina Do Soro De Queijo**. 2003. 155 f. Universidade Federal de Viçosa, 2003.