



RENORBIO  
REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO

**ESTUDO DA IMOBILIZAÇÃO DAS ENZIMAS NEUTRASE E L-ARABINOSE  
ISOMERASE EM SUPORTES DE BAIXO CUSTO**

**GERLA CASTELLO BRANCO CHINELATE**

**FORTALEZA – CE**  
Abril/2013



**RENORBIO  
REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO**

**ESTUDO DA IMOBILIZAÇÃO DAS ENZIMAS NEUTRASE E L-ARABINOSE  
ISOMERASE EM SUPORTES DE BAIXO CUSTO**

Tese de Doutorado apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação da Rede  
Nordeste de Biotecnologia-RENORBIO,

Área de concentração: Biotecnologia  
Industrial

Linha de Pesquisa: Bioprocessos

**GERLA CASTELLO BRANCO CHINELATE**

**Orientadora: Profa. Dra. LUCIANA ROCHA BARROS GONÇALVES**

**FORTALEZA – CE**  
Abril/2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

---

C466e Chinelate, Gerla Castello Branco.  
Estudo da imobilização das enzimas neutrase e l-arabinose isomerase em suportes de baixo custo /  
Gerla Castello Branco Chinelate. – 2013.  
132 f. : il., enc. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Departamento  
RENORBIO, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Fortaleza, 2013.

Área de Concentração: Biotecnologia Industrial.

Orientação: Prof. Dra. Luciana Rocha Barros Gonçalves.

1. Fibras – Alimentos. 2. Quitosana. 3. Coco. 4. Bagaço de caju. I. Título.

---

CDD 660.6

**GERLA CASTELLO BRANCO CHINELATE**

Tese apresentada a Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO) para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia Industrial

Aprovada em 29 de abril de 2013 por:

Profa Dra. Luciana Rocha Barros Goncalves  
Universidade Federal do Ceara (UFC)  
Presidente

~~Profa Dra. Sueli Rodrigues~~  
Universidade Federal do Ceara (UFC)

~~Prof. Dr. Ivanildo Jose da Silva Junior~~  
Universidade Federal do Ceara (UFC)

Dra. Ana Iraidy Santa Brigida  
Pesquisadora da EMBRAPA Agroindustria de Alimentos

~~Dra. Talita Lopes Honorato~~  
Universidade Federal do Ceara (UFC)

*Ao Arthur Giovanni, meu filho.*

**DEDICO!**

*À Maria das Graças, minha mãe;*

*Ao José Paulo, meu pai;*

*Ao Arthur Medeiros, meu esposo.*

**OFEREÇO!**

## AGRADECIMENTOS

Sem dúvida, essa é uma das partes mais importantes deste trabalho, pois foram muitas contribuições que recebi para cumprir mais esta meta tão importante na minha vida.

A ordem de agradecimentos não indica maior ou menor importância da contribuição, mas apenas a cronologia, visto que sem a ajuda, incentivo e apoio de qualquer um destes colaboradores o percurso seria mais difícil.

À DEUS, por ter me dado a oportunidade da VIDA, de chegar aonde cheguei e poder ajudar o próximo com os conhecimentos adquiridos ao longo da jornada. Aos mentores espirituais que me guiaram nestes longos 4 anos de curso de doutorado.

Aos meus pais Graça e Paulo, que sempre me incentivaram e torceram para que eu buscasse aperfeiçoamento profissional, talvez, como uma única forma de tentar galgar alguns degraus na sociedade excludente em que vivemos. Amo vocês! Obrigada por serem os maiores incentivadores de todos os tempos que já conheci. Sem vocês eu não conseguiria! À mamãe pelas palavras certas nas horas certas... Ao papai pela calma transmitida e pelos calos nas mãos cortando as fibras da casca de coco verde utilizadas neste trabalho.

Ao meu filho Arthur Giovanni, por ser peça fundamental da minha existência... Que compartilha dos meus dias, das minhas alegrias e das minhas dificuldades de vencer cada momento. Você me faz sentir especial e me dá coragem para continuar enfrentando os obstáculos da vida!

Ao meu esposo Arthur Medeiros, pela infinita paciência em todos os momentos, principalmente pela compreensão da importância da conclusão deste ciclo e pelas minhas ausências. Amorção, este título também é seu!

Aos meus irmãos Fabinho, Graciela, Paulinho, Sandrinho e Netinho; os sobrinhos Breno, Gabriel, Giuseppe e Davi que, mesmo distantes, estavam tão dentro do meu coração passando-me energias positivas em palavras de incentivo e carinho.

À vovó Nanu e Dona Bete, minha sogra, que me acolheram e cuidaram de mim nas minhas idas e vindas, pelo carinho e atenção.

À minha orientadora Professora Luciana que aceitou minha orientação colocando-me em um dos seus grandes projetos de pesquisa.

À Universidade Estadual do Ceará (UECE) – Secretaria Geral do RENORBIO, à Universidade Federal do Ceará (UFC) e à Coordenação do Curso de Pós-graduação em Biotecnologia (RENORBIO/UFC) pela oportunidade de realização do curso..

Ao colega Prof<sup>o</sup> Wellington Adriano, pela companhia na missão em Santa Fé-Argentina e pela força dada nos caminhos dos artigos a serem publicados.

À toda a equipe da Universidade Del Litoral em Santa Fé-Argentina, especialmente ao anfitrião Prof. Enrique Mammarella e família CONICET pela atenção, orientação e momentos agradáveis de aprendizado.

À banca examinadora Prof<sup>a</sup> Dra. Sueli, Prof<sup>o</sup> Dr. Ivanildo, Prof<sup>o</sup> Dr. Wellington, Dra. Ana Iraidy e Dra. Talita, pelas críticas construtivas e confiança no trabalho desenvolvido.

Aos caríssimos colegas do GPBio/DEQ/UFC que me acolheram, dando-me suporte de integração e apoio, em especial ao grupo de enzimas Felipe, Ulisses, Cleiton, Leonardo, Cristiane e Marylane. Forte abraço... sinto saudades de todos vocês.

Aos irmãos do coração Derla, Clayton, Leandro, Vlândia, Ana Maria, Sandrinha, Andeile e Dell que desde o início desta etapa de doutorado são minhas companhias sinceras e os ombros amigos nos momentos de maior dificuldade; e pelo sorriso e alegria nos momentos de descontração.

Aos colegas funcionários do Departamento de Tecnologia de Alimentos/UFC pela boa convivência na minha chegada e partida, especialmente ao Augusto, Henrique, Pereira e Marina que nunca deixaram minha peteca cair.

Aos colegas da Universidade Federal de Campina Grande, câmpus de Pombal, especialmente André Leandro, Cybelle Oliveira, Roberto Miranda e Ingridt Milenna; e Jorge Cavalcanti e Thibério Sousa, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, por terem me acudido quando minhas forças mentais já estavam cessando. Aos meus alunos, membros do GPLac, fiéis torcedores pela conclusão deste trabalho. Essa é de vocês também!

Ao CNPQ, pelo financiamento do projeto e oportunidade de realizar parte do doutorado na Argentina.

Enfim, meu coração será eternamente grato a todos que tornaram possível este sonho. Novas etapas surgirão e espero contar novamente com vocês. Mais uma vez: Muito Obrigada!

*Gerla Castello Branco Chinelate*

*“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em encontrar uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos.”*

*Isaac Newton*

## RESUMO

Por razões da necessidade de aperfeiçoar estudos de imobilização das enzimas Neutrase e L-arabinose isomerase, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial de materiais como o bagaço de caju (CAB), fibra da casca de coco verde (FCV) e quitosana (QUIT) como suportes naturais e de baixo custo. Para a Neutrase, os três suportes estudados sofreram tratamentos químicos e ativações com glicidol, epicloridrina e glutaraldeído. A imobilização da Neutrase contou com a concentração de enzima oferecida para todos os suportes foi de 8,8 U/mL (51 mg de proteína.g<sup>-1</sup>) a 25°C por 3 horas. As atividades de Neutrase solúvel e imobilizadas foram avaliadas através de análise espectrofotométrica a 700 nm de acordo com o ensaio de TCA-Lowry. Os derivados foram analisados quanto ao rendimento da imobilização (RI), atividade recuperada (ARec), tempo de meia-vida ( $t_{1/2}$ ) e fator de estabilização térmica (FE) a 60°C, comparado com a enzima solúvel. Para FCV lavada, o melhor RI de 79,45% e 63,40% de ARec, apresentando FE quatro vezes maior que a enzima neutrase solúvel, quando ativada com glutaraldeído. Para CAB ativada com epicloridrina, apresentou melhor RI de 96,31% e 50,22% ARec. Os suportes de QUIT-2,5% ativados com glutaraldeído apresentaram melhores resultados de RI de 75,44%, 91,12% de ARec e FE cinco vezes maior que a enzima solúvel, sendo avaliadas também sua estabilidade operacionais com queda de até 41% após 10 ciclos. Para a enzima L-arabinose isomerase foram estudadas as melhores condições de atividade desta enzima em sua forma solúvel e desenvolver protocolo de imobilização em suporte versátil e barato como quitosana-alginato epoxilado. Soluções de enzima em tampão de acetato de sódio, citrato de sódio e fosfato de sódio, na faixa de pH variando de 3,8 a 8,5 mantendo-se sob agitação a 25°C e 50°C. As melhores condições de atividade da L-arabinose isomerase solúvel apresentaram com tampão acetato pH 5,5, tampão citrato pH 5,5, tampão fosfato pH 7,5 e 8,0. Os derivados foram analisados quanto ao rendimento da imobilização (RI), atividade recuperada (ARec), tempo de meia-vida ( $t_{1/2}$ ) e fator de estabilização térmica a 75°C (FE), comparados com a enzima solúvel. Em imobilizações em pH 8,0 apresentaram maior RI em tampão fosfato 50 mM após 24h, com 90,21% de ARec, em temperatura de 25°C,  $t_{1/2}$  de 44h a 75°C, perda de 4,45% na atividade durante o estudo de estabilidade operacional com 10 ciclos e perda de 1,83% da atividade durante 90 dias de estocagem quando comparados com pH mais baixos, em reatores descontínuos. Os resultados alcançados atraem um interesse considerável devido a uma grande variedade de aplicações possíveis, por exemplo, na produção de proteínas e peptídeos, para a melhoria da textura e propriedades sensoriais de produtos lácteos, bem como na síntese, isomerização e produção de D-tagatose.

**Palavras-chave:** neutrase, l-arabinose isomerase, fibra da casca de coco verde, bagaço de caju, quitosana, suporte de baixo custo.

## ABSTRACT

For reasons of the need to improve studies of enzyme immobilization Neutrased and L-arabinose isomerase, the present study aimed to evaluate the potential of materials like cashew apple bagasse (CAB), coconut shell fiber (FCV) and chitosan (QUIT) as supports natural and with low cost. Neutrased for the three media studied underwent chemical treatments and activation with glycidol, epichlorohydrin and glutaraldehyde. The immobilized Neutrased counted on the enzyme concentration offered to all substrates was 8.8 U/mL (51 mg proteina.g<sup>-1</sup>) at 25°C for 3 hours. The activities of soluble and immobilized Neutrased were evaluated by spectrophotometric analysis at 700 nm according to the TCA-Lowry assay. The derivatives were analyzed for yield of immobilization (RI), activity recovered (AREC), half-life (t<sub>1/2</sub>) and thermal stabilization factor (SF) of 60°C, compared with the soluble enzyme. For FCV washed best RI 79,45% and 63,40% of AREC presenting FE four times the enzyme Neutrased soluble when activated with glutaraldehyde. For CAB activated with epichlorohydrin, showed better RI 96,31% and 50,22% AREC. Supporters of QUIT-2,5% activated glutaraldehyde showed better results of IR 75.44%, and 91.12% of AREC, SF five times greater than the soluble enzyme and evaluated their stability also operating with a drop of up to 41% after 10 cycles. For the enzyme L-arabinose isomerase were studied optimum conditions for activity of this enzyme in soluble form and develop protocol for immobilization support versatile and cheap as chitosan-alginate epoxytated. Solutions of enzyme in buffer sodium acetate, sodium citrate and sodium phosphate, at pH ranging from 3,8 to 8,5 keeping under stirring at 25°C and 50°C. The best conditions for the activity of L-arabinose isomerase soluble presented with acetate buffer pH 5,5; citrate buffer pH 5,5; phosphate buffer pH 7,5 and 8,0. The derivatives were analyzed for yield of immobilization (RI), activity recovered (AREC), half-life (t<sub>1/2</sub>) and thermal stabilization factor at 75 °C (SF), compared with the soluble enzyme. In fixed at pH 8,0 showed higher RI in 50 mM phosphate buffer after 24 hours, with 90,21% of AREC, at 25°C, t<sub>1/2</sub> of 44h at 75°C, 4.45% loss in activity during the stability study operating with 10 cycles and 1,83% loss of activity during 90 days of storage as compared to lower pH, in batch reactors. The results attract considerable interest due to a variety of possible applications, for example in the production proteins and peptides, for improving the texture and sensory properties of dairy products as well as isomerization on the synthesis and production of D-tagatose.

**Keywords:** neutrased, l-arabinose isomerase, cashew apple bagasse, coconut shell fiber, chitosan, low-cost support.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química da lactose .....	27
Figura 2. Reação de hidrólise enzimática de lactose através do uso de $\beta$ -galactosidase. <b>Erro! Indicador não definido.</b>	
Figura 3. O quarto carbono quiral em imagem-espelho da D-frutose. *Carbono quiral.....	35
Figura 4. Diagrama esquemático do processo de produção de D-tagatose da indústria. D-tagatose poderia ser fabricado por meio de métodos químicos e biológicos, seletivamente utilizando soro de leite ou lactose como os materiais de partida. ....	36
Figura 5. Principais métodos de imobilização de enzimas. ....	39
Figura 6. Estrutura dos biopolímeros quitosana (a), quitina (b) e celulose (c). ....	46
Figura 7. Fluxograma de obtenção da fibra da casca de coco verde. ....	68
Figura 8. Tratamento do bagaço de caju.....	70
Figura 9. Estabilidade Térmica a 60°C dos derivados obtidos a partir da imobilização de Neutrase em suporte de Fibra da Casca de Coco Verde ativados com Glicidol. ....	83
Figura 10. Estabilidade Térmica a 60°C dos derivados obtidos a partir da imobilização de Neutrase em suporte de Fibra da Casca de Coco Verde ativados com Epicloridrina. ....	84
Figura 11. Estabilidade Térmica a 60°C dos derivados obtidos a partir da imobilização de Neutrase em suporte de Fibra da Casca de Coco Verde ativados com Glutaraldeído. ....	86
Figura 12. Estabilidade Térmica a 60°C dos derivados obtidos a partir da imobilização de Neutrase em suporte de bagaço de caju (CAB). ....	87
Figura 13. Estabilidade Térmica a 60°C dos derivados obtidos a partir da imobilização de Neutrase em suporte de quitosana 2,5% (A) e quitosana 5,0% (B). ....	89
Figura 14. Estabilidade Operacional da Neutrase imobilizada a 25°C, em quitosana 2,5% (■) .....	90
Figura 15. Neutrase® teoricamente imobilizada (mg de proteína.g-1de gel) em função da massa de proteína oferecida. ....	92
Figura 16. Efetividade da Neutrase® imobilizada em função da carga enzimática oferecida. ....	93
Figura 17. Ajuste do modelo de Michaelis-Menten para a reação de hidrólise da caseína..	94
Figura 18. Efeitos do pH e da temperatura na atividade relativa da L-AI solúvel em 5 min (■) e 5h (●), em tampão acetato a 25°C (A) e a 50°C (B). Atividade relativa de 100% correspondente ao maior valor bruto em U/mL. ....	112
Figura 19. Efeitos do pH e da temperatura na atividade relativa da L-AI solúvel em 5 min (■) e 5h (●), em tampão citrato a 25°C (A) e a 50°C (B). Atividade relativa de 100% correspondente ao maior valor bruto em U/mL. ....	113
Figura 20. Efeitos do pH e da temperatura na atividade relativa da L-AI solúvel em 5 min (■) e 5h (●), em tampão fosfato a 25°C (A) e a 50°C (B). Atividade relativa de 100% correspondente ao maior valor bruto em U/mL. ....	114
Figura 21. Estabilidade Térmica da L-AI solúvel (■) e imobilizada (♦) a 75°C, no tampão acetato, pH 5,5. As curvas representam a aproximação do modelo de Sadana e Henley (1987).....	118

Figura 22. Estabilidade Térmica da L-Al solúvel (■) e imobilizada (◆) a 75°C, no tampão citrato, pH 5,5. As curvas representam a aproximação do modelo de Sadana e Henley (1987). .....	118
Figura 23. Estabilidade Térmica da L-Al solúvel (■) e imobilizada (◆) a 75°C, no tampão fosfato, pH 7,5. As curvas representam a aproximação do modelo de Sadana e Henley (1987). .....	119
Figura 24. Estabilidade Térmica da L-Al solúvel (■) e imobilizada (◆) a 75°C, no tampão fosfato, pH 8,0. As curvas representam a aproximação do modelo de Sadana e Henley (1987). .....	119
Figura 25. Estabilidade Operacional da L-Al imobilizada a 25°C, em tampão fosfato: (■) pH 7,5 e (■) 8,0. ....	121
Figura 26. Estabilidade de Estocagem da L-Al imobilizada a 25°C, nos tampões fosfato pH 7,5 (■) e fosfato 8,0 (■) estudados. ....	122

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição centesimal média para leite, soro, queijo semiduro e a respectiva cifra de transição. ....	22
Tabela 2 – Composição do soro doce e do soro ácido.....	25
Tabela 3 – Classificação internacional das enzimas. ....	31
<b>Tabela 4</b> - Efeito do suporte e método de ativação na imobilização da Neutrase® em suporte de fibra de coco verde (FCV) ativadas por glicidol com carga oferecida de 5,1 mg de enzima.g <sup>-1</sup> gel (8,8 U.g <sup>-1</sup> gel) por 3h, sendo (RI) rendimento de imobilização, (ARec) atividade recuperada, (t <sup>1/2</sup> ) tempo de meia-vida e (FE) fator de estabilização a 60°C. <sup>1,2</sup> .....	77
<b>Tabela 5.</b> Efeito do suporte e método de ativação na imobilização da Neutrase® em suporte de fibra de coco verde (FCV) ativadas por epicloridrina com carga oferecida de 5,1 mg de enzima.g <sup>-1</sup> gel (8,8 U.g <sup>-1</sup> gel) por 3h, sendo (RI) rendimento de imobilização, (ARec) atividade recuperada, (t <sup>1/2</sup> ) tempo de meia-vida e (FE) fator de estabilização a 60°C. <sup>1,2</sup> .....	78
Tabela 6. Efeito do suporte e método de ativação na imobilização da Neutrase® em suporte de fibra de coco verde (FCV) ativadas por glutaraldeído com carga oferecida de 5,1 mg de enzima.g <sup>-1</sup> gel (8,8 U.g <sup>-1</sup> gel) por 3h, sendo (RI) rendimento de imobilização, (ARec) atividade recuperada, (t <sup>1/2</sup> ) tempo de meia-vida e (FE) fator de estabilização a 60°C. <sup>1,2</sup> .....	79
Tabela 7. Efeito do suporte e método de ativação na imobilização da Neutrase® em suporte de bagaço de caju (CAB) ativadas por glicidol, epicloridrina e glutaraldeído, com carga oferecida de 5,1 mg de enzima.g <sup>-1</sup> gel (8,8 U.g <sup>-1</sup> gel) por 3h, sendo (RI) rendimento de imobilização, (ARec) atividade recuperada, (t <sup>1/2</sup> ) tempo de meia-vida e (FE) fator de estabilização a 60°C. <sup>1,2</sup> .....	80
<b>Tabela 8.</b> Efeito do suporte e método de ativação na imobilização da Neutrase® em suporte de quitosana (QUIT) ativadas por glicidol, epicloridrina e glutaraldeído, com carga oferecida de 5,1 mg de enzima.g <sup>-1</sup> gel (8,8 U.g <sup>-1</sup> gel) por 3h, sendo (RI) rendimento de imobilização, (ARec) atividade recuperada, (t <sup>1/2</sup> ) tempo de meia-vida e (FE) fator de estabilização a 60°C. <sup>1,2</sup> .....	81
Tabela 10. Parâmetros de imobilização de <i>L-arabinose isomerase</i> em suportes de quitosana-alginato epoxilado 2,5% (m/m). Carga oferecida de 22,76 mg de proteína.g <sup>-1</sup> gel, após 5 min, 5h e 24 h de contato enzima-suporte. Sendo (RI) rendimento de imobilização, (A <sub>R</sub> ) atividade recuperada, (A <sub>T1</sub> ) atividade teórica de imobilização e (AAP) atividade aparente. Ensaio: (1) Tampão Acetato 50 mM /pH 5,5, (2) Tampão Citrato 50 mM /pH 5,5, (3) Tampão Fosfato 50 mM/pH 7,5 e (4) Tampão Fosfato 50 mM /pH 8,0 ... <b>Erro! Indicador não definido.</b>	
Tabela 2. Valores estimados para as constantes de desnaturação térmica ( <i>K<sub>d</sub></i> ), em função da temperatura de 75°C, aplicando modelo de Sadana e Henley (1987). <b>Erro! Indicador não definido.</b>	

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAp	Atividade Aparente, Atividade do Derivado
APTS	3-aminopropiltriétoxissilano
ARec	Atividade Recuperada
ATI	Atividade Teórica de Imobilização
BSA	Albumina de Soro Bovino
CAB	Cashew apple bagasse (Bagaço de caju)
CLEAs	<i>Cross-linked enzyme aggregates</i>
DSC	Carbonato de N-N'-disuccinimidila
DSS	Suberato de N-N'-disuccinimidila
FAO	Food and Agriculture Organization
FCV	Fibra da casca de coco verde
FDA	Food and Drug Administration
FE	Fator de Estabilização Térmica
GOS	Glico-oligossacarídeo
GRAS	Geralmente Reconhecido como Seguro
L-AI	L-arabinose isomerase
OCED	Organização para a Cooperação Econômica e Desenvolvimento
PGA	<i>Penicilium</i> G-acilase
QUIT	Quitosana

RI	Rendimento da Imobilização
TCA	Ácido Tricloro Acético
WPC	Whey Protein Concentrate (Concentrado de Proteínas do Soro)

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
2. REVISÃO BIBLIOGRAFICA.....	21
2.1 Leite.....	21
2.2 Queijos.....	22
2.3 Soro de Leite.....	23
2.3.1 <i>Proteínas do soro</i> .....	26
2.3.2 <i>Lactose</i> .....	27
2.4 Enzimas.....	29
2.4.1 <i>Neutrase</i> .....	32
2.4.2 <i>L-arabinose isomerase</i> .....	33
2.5 Imobilização Enzimática.....	37
2.6 Suportes de Imobilização.....	41
2.6.1 <i>Fibra da casca do coco verde</i> .....	42
2.6.2 <i>Bagaço de Caju</i> .....	44
2.6.3 <i>Quitosana</i> .....	45
2.7 Modificação Química dos Suportes.....	47
2.8 Referências Bibliográficas.....	49
3. ARTIGOS DERIVADOS DA TESE: <i>Neutrase</i> .....	62
IMOBILIZAÇÃO DE NEUTRASE EM BIOCATALISADORES DE BAIXO CUSTO.....	63
4. ARTIGOS DERIVADOS DA TESE: <i>L-arabinose isomerase</i> .....	99
IMOBILIZAÇÃO DA L-ARABINOSE ISOMERASE EM SUPORTE DE BAIXO CUSTO À BASE DE QUITOSANA.....	100
5. CONCLUSÕES.....	128

---

*Capítulo 1*

*Introdução*

---

## 1. INTRODUÇÃO

No escopo das aplicações biotecnológicas, um dos presentes desafios da biotecnologia é o desenvolvimento de novos processos para o tratamento de resíduos agroindustriais, contribuindo para a diminuição dos potenciais problemas ambientais (SERPA, 2009). Diferentes processos industriais produzem resíduos que necessitam de destino adequado (PELIZER, 2007), mas que na maioria das vezes são descartados sem nenhum tratamento prévio em corpos d'água (rios, lagos, mares), acarretando morte dos peixes e outros organismos aquáticos, comprometendo ainda, a estrutura físico-química dos solos, acentuando, a poluição ambiental (ALMEIDA & CABALLERO, 2004; DELLAMATRICE, 2005; OGRODOWSKI, 2006).

O soro de queijo é uma importante fonte de nutrientes já que contem um pouco mais de 25% das proteínas do leite, 8% de ácidos graxos e 95% de lactose (SMITHERS Y COPELAND, 1997). Conseqüentemente, é importante incorporá-lo como base de alimentos, preferencialmente para o consumo humano com a finalidade adicional de não contaminar o meio-ambiente com o rejeito de empresas de laticínios e recuperar o valor monetário do soro através de produtos de alto valor agregado.

A alternativa mais estudada nos últimos anos é a recuperação dos nutrientes de alta qualidade que tem o soro de queijo mediante aplicação de processos utilizando membranas e transformando-o em pó (BYRNE Y FITZPATRICK, 2002). Assim, pode-se encontrar em algumas indústrias de laticínios processos para obtenção de soro desidratado, desmineralizado, concentrados protéicos e lactose refinada. Estes processos precisam de um elevado custo de instalação e operação e os produtos obtidos possuem baixo valor econômico. Dentro das possibilidades terapêuticas atuais para o tratamento de pacientes com problemas congênitos de metabolismo, a dieta constitui no pilar mais importante da terapêutica destes transtornos e o soro de queijo tem componentes muito valiosos para transformá-los em ingredientes funcionais para a elaboração de alimentos especiais que forneçam

às células humanas a energia química necessária a seu metabolismo e manter suas funções vitais e realizar qualquer tipo de trabalho (SANJURJO P., 1994).

Diante de possibilidades já existentes para o aproveitamento tem-se, no caso das lacto proteínas, o emprego de enzimas proteolíticas como a neutrase e alcalase para conseguir frações peptídicas menos alergênicas (TOLKACH Y KULOZIK, 2005; GUADIX, 2006) e com propriedades físicas especiais para o emprego como substituto de gorduras. No caso da lactose, uma das alternativas é a obtenção de galacto-oligossacarídeos (GOS) que são subprodutos da hidrólise enzimática da lactose para preparações em novos alimentos prebióticos (TOMITA, 2002) e a transformação de glicose e galactose por via enzimática em D-tagatose (RYU, 2003), respectivamente. Esta última é uma substância edulcorante, não carcinogênica e de baixo valor calórico, indicada para diabéticos.

Em síntese, ainda não existem pesquisas suficientemente completas que permitam viabilizar a aplicabilidade de processos químicos e enzimáticos conhecidos para obtenção de compostos derivados da lactose e das proteínas do soro de queijo com alta potencialidade funcional para o desenvolvimento de alimentos especiais. Apesar das excelentes perspectivas que apresentam as enzimas como catalisadores, sua aplicação industrial não é tão imediata porque, apesar das vantagens mencionadas, as enzimas apresentam outras características que, embora desejáveis para a operação da máquina celular, limitam a sua utilização em escala industrial. As principais dificuldades se devem, primeiro, à solubilidade destas no meio de reação, o que inviabiliza economicamente sua separação dos produtos.

Uma vez que a enzima está solúvel e em baixa concentração no meio, pois é um potente catalisador, sua recuperação seria muito cara. O segundo problema é a instabilidade operacional das enzimas que é desejável na célula viva, pois para esta é mais econômico fazer a síntese “de novo” do que armazenar enzimas que não estão sendo utilizadas. Para uso industrial, contudo, a utilização de enzimas como matéria-prima não reciclável tem inviabilizado seu uso, pois enzimas têm custo alto. Como consequência dessas dificuldades, somente algumas se convertem em catalisadores de um processo industrial.

Esta escassez de processos enzimáticos em escala industrial é o resultado da ausência de estudos integrais que deem soluções aos problemas existentes quando se propõe o projeto de uma reação enzimática. A imobilização e estabilização das enzimas - engenharia enzimática - é a etapa das mais importantes

no projeto global, pois permite superar as desvantagens da solubilidade no meio reacional e da instabilidade operacional no uso industrial das enzimas, tornando-as catalisadores ideais para a produção e transformação de compostos bioativos, seja na indústria alimentícia, de química fina ou farmacêutica.

A imobilização consiste no confinamento da enzima em um suporte sólido para posterior reutilização do biocatalisador, tornando o processo menos oneroso. Em geral, a imobilização oferece uma série de vantagens e as razões para a escolha de um derivado imobilizado variam de aplicação para aplicação, incluindo: utilização da atividade catalítica por um maior período de tempo; possibilidade de operação contínua do processo, com maior facilidade de controle; facilidade de separação do produto final; em alguns casos, ocorre modificação favorável das propriedades catalíticas da enzima como, por exemplo, maior estabilidade ao pH e à temperatura, entre outros; facilidade de interrupção da reação, em um nível desejado, pela remoção da enzima, caso o processo seja batelada, ou ajuste do tempo de residência se é usado um reator contínuo (MENDES, 2011).

Para que o emprego de enzimas imobilizadas torne-se um processo economicamente viável, deve-se considerar o tipo de suporte empregado assim como o método de imobilização. Entre os métodos de imobilização de enzimas, disponíveis na literatura, destacam-se adsorção em materiais insolúveis, copolimerização empregando um monômero reativo, encapsulação em gel ou ligação covalente em suporte insolúvel, via reação entre grupos funcionais da proteína e grupos reativos na superfície do suporte. Diferentes suportes têm sido empregados como matrizes para imobilização de várias enzimas, entre eles destacam-se os suportes orgânicos como dextrana, quitina e quitosana, os inorgânicos fosfato de zircônio, óxido de nióbio e materiais silícios, matrizes poliméricas amberlite, poliacrilonitrila e resinas constituídas de estireno e divinilbenzeno (PORTO, 2002). Vale ressaltar que, dependendo das condições de imobilização e dos suportes empregados, a enzima apresentará diferentes propriedades finais, podendo mudar sua estabilidade frente a pH e temperatura.

O elevado custo de suportes à base de sílica e polímeros sintéticos incentiva pesquisas na busca de substâncias baratas como carbonato de cálcio, quitina e quitosana e outras matérias-primas típicas da Região Nordeste do Brasil, como por exemplo, fibra de casca de coco verde e bagaço do pedúnculo do caju.

Frente aos diversos suportes estudados para imobilização de enzimas, os resíduos agroindustriais têm se apresentado como uma fonte de matéria-prima de baixo custo. A quitosana (poli-N-acetilglicosamina) é um oligosacarídeo derivado da quitina, um dos polímeros mais abundantes na natureza, o qual pode ser facilmente obtido de fontes naturais como o rejeito de indústrias pesqueiras, principalmente nas carapaças dos crustáceos, notadamente camarão, lagosta e caranguejo, constituindo cerca de 30% do exoesqueleto destes últimos. No caso do Ceará, isto é uma grande vantagem devido à fácil aquisição e a grande atividade pesqueira existente em nosso litoral, conseqüentemente, barateando os custos que chegam a US\$ 7,5/10g na Índia, Japão, Polônia, Noruega, Austrália (KUMAR, 2000). Importantes aplicações da quitosana na indústria farmacêutica incluem seu uso como complemento alimentar, com a função de remover a gordura de alimentos antes que estes sejam metabolizados pelo organismo, antiácido, inibidor de cáries, controlador da pressão sanguínea, redutor do nível de ácido úrico e promotor do aumento de cálcio contribuindo, assim, para o fortalecimento dos ossos. Ressalta-se que a quitosana é um produto de baixo custo, por ser um resíduo da indústria de pesca, não tóxico e possuidor de grupos amino primários funcionais em potencial, uma importante característica como suporte para imobilização de enzimas. Cabe ainda mencionar que esta matriz vem sendo estudada como suporte de imobilização de enzimas com a obtenção de resultados promissores (ADRIANO, 2008a; RODRIGUES, 2005).

Neste contexto, dentro de uma política de utilização integral do soro de queijo, faz-se necessário trabalhar e desenvolver novos processos mais factíveis e menos onerosos a fim de se obter vários compostos com maior valor agregado e que apresentem efeitos positivos para a saúde humana. Diante disso, o objetivo deste foi obter catalizadores imobilizados para aplicações na indústria de alimentos, visando especialmente futuras aplicações nos processos de obtenção de hidrolisados proteicos e D-tagatose.

---

*Capítulo 2*

*Revisão Bibliográfica*

---

## 2. REVISÃO BIBLIOGRAFICA

### 2.1 Leite

O leite é uma secreção fluida das fêmeas de todas as espécies de mamíferos. Pela legislação brasileira, entende-se por leite, sem outra especificação, o produto oriundo da ordenha completa e ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas (BRASIL, 2011). Mais de 4 mil espécies de mamíferos o produzem, com a função primordial de suprir as necessidades nutricionais dos recém-nascidos, além de fornecer os nutrientes essenciais para os neonatos, o leite também exerce uma série de funções fisiológicas por meio de suas proteínas e peptídios, por exemplo, fornecendo imunoglobulinas, enzimas, inibidores enzimáticos, ligando-se ou transportando proteínas, fatores de crescimento e agentes antibacterianos (ANTUNES, 2003).

No Brasil, a produção total de leite foi de 32,0 bilhões de litros em 2011, aumento de 4,5% em relação a 2010 (IBGE, 2012b).

O leite é um sistema de grande complexidade. Representa a secreção trifásica da glândula mamária, onde se encontram glóbulos de gordura emulsificados em micelas de caseína e outras proteínas coloidalmente dispersas, lactose, vitaminas e sais orgânicos e inorgânicos dissolvidos na fase contínua que é a água. A composição aproximada varia em razão da estação do ano e reflete diferenças entre raças, estágio de lactação e o sistema de alimentação. Como valores médios, são aceitos 4,0% de gordura, 3,5% de proteína, 4,8% de lactose e 0,7% de sais, sendo água o restante (ANTUNES, 2003).

Segundo Bortoli (2005), é uma alternativa de fonte proteica acessível à população de baixa renda, que geralmente é carente em proteína de origem animal, comprovando a importância sócio-econômica deste alimento. Conforme Tronco (2003), o leite tem sido utilizado na alimentação humana por oferecer uma equilibrada composição de nutrientes que resulta em elevado valor biológico, sendo considerado um dos alimentos mais completos. Por isso, é extremamente importante apresentar-se com qualidade (FONSECA, 2000) e ser apto para produzir derivados

como queijos, iogurtes, bebidas lácteas, doces de leite, leite em pó, leite condensado e subprodutos como soro de leite em pó, ricotas, dentre outros.

## 2.2 Queijos

Dentro do vasto mercado mundial de produção de queijo de leite de vaca, o Brasil destaca-se frente aos países da América do Sul e outros continentes com uma produção anual de 580 milhares de toneladas em 2007 (EMBRAPA, 2012).

A fabricação de queijos consiste na concentração do extrato seco do leite por meio da coagulação da caseína. Durante o processo de coagulação há a transferência de componentes do leite para a massa e para o soro, conhecido como cifra de transição, fator responsável pela composição físico-química do soro e do queijo. Segundo Vilela (2009), a cifra de transição dos sólidos lácteos para a massa para um queijo semiduro obedece aos atributos apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 – Composição centesimal média para leite, soro, queijo semiduro e a respectiva cifra de transição.

Componente	Leite	Queijo	Soro	Transição para o queijo
Lactose (% m/m)	4,7	0,2	4,5	4%
Gordura (% m/m)	3,4	3,1	0,3	91%
Proteína (% m/m)	3,1	2,3	0,8	74%
Minerais (% m/m)	0,9	0,5	0,4	60%
Sólidos totais (% m/m)	12,1	6,1	6,0	50%

Fonte: Vilela (2009).

A fabricação de queijo é um método de transformação de componentes do leite em um produto de fácil conservação, menor volume, alto valor nutritivo, sabor agradável e boa digestibilidade (GRANDI, 1983). Contudo, com a fabricação do queijo, gera-se conseqüentemente o subproduto soro de leite. Estima-se que para produção de 1 kg de queijo, obtem-se em torno de 9 litros de soro de leite. Assim o aumento do consumo de queijo tem acarretado em uma maior produção deste resíduo industrial.

Este rejeito da indústria de laticínios, quando não aproveitado devido sua elevada demanda química de oxigênio e alto teor de gordura, requer tratamentos determinados pela legislação para seu correto despejo no meio ambiente,

minimizando ao máximo seu impacto ambiental. Porém, tal prática ainda é desrespeitada por muitas indústrias, principalmente pelos custos gerados pelo processo.

Segundo Farias (2012), a produção brasileira de queijo inspecionada (SIF, Serviço de Inspeção Federal do Ministério de Agricultura) é de aproximadamente 500 mil toneladas (ABIQ, Associação Brasileira das Indústrias de Queijo) e dá origem a um volume estimado de 4,5 bilhões de litros de soro de leite.

Com o avanço da tecnologia, a produção de queijos passou de um processo estritamente tradicional, onde existiam apenas pequenas queijarias, sem meios econômicos ou tecnológicos disponíveis para o reaproveitamento do soro de leite, (ALMEIDA & CABALLERO, 2004) para um processo industrial, onde as Indústrias de grande porte o reutilizam para a produção de bebidas lácteas e principalmente no enriquecimento de seus próprios produtos, gerando em contrapartida, um bioproduto de interesse econômico. Mas, este tipo de reaproveitamento atinge apenas as grandes indústrias, que representam 15% do total de soro produzido, necessitando com isso de alternativas economicamente mais viáveis para o reaproveitamento deste subproduto (OLIVEIRA, 2006; ROEPCKE & SOCCOL, 2007).

### 2.3 Soro de Leite

O soro de leite, também conhecido como soro de queijo pode ser definido como um líquido opaco, amarelo-esverdeado, remanescente do processo de fabricação de queijos, após a precipitação da caseína por meio de coagulação ácida ou enzimática, retendo cerca de 55 % dos nutrientes contidos naturalmente no leite (ALVES & MARTINS, 2005; SGARBIERI, 2005 e LIRA, 2009). Dependendo da sua forma de obtenção, o soro pode distinguir-se em dois tipos, sendo eles, o soro ácido, resultante da coagulação ácida, originando-se dos queijos tipo frescal, como o queijo Cottage, de menor utilização pelas indústrias, devido ao seu baixo conteúdo protéico e alto grau de cinzas; e o soro doce, procedente da coagulação enzimática, proveniente da produção de queijos como Cheddar, Mozzarella, Suíço, e Monterey (ORDOÑEZ, 2005; BONATO, 2006; PELEGRINE & CARRASQUEIRA, 2008).

O aumento na produção de queijos acarretou em grande volume de soro descartado em rios e lagos. O soro é um poluente em potencial, pois apresenta

altíssima demanda biológica de oxigênio, com as comprovações científicas do valor nutricional de seus constituintes e com o desenvolvimento de técnicas de fracionamento, o soro é amplamente requisitado como ingrediente ou como precursor de ingredientes na indústria de alimentos (GERNIGON, 2010). De acordo com Giraldo-Zuniga (2002), estima-se que a produção mundial de soro gire ao redor de 120 milhões de toneladas. O aumento da produção de soro no Brasil e, paralelamente a implementação das leis de proteção ao meio ambiente, bem como o reconhecimento de que o uso do soro líquido para a alimentação animal só é regionalmente e de forma restritamente praticável, está levando a indústria a analisar as opções de industrialização e aproveitamento (TIBA, 1984).

Os resíduos podem ser definidos como a diferença no balanço de massa e energia nos processos de transformação de matérias-primas em produtos (GIROTO, 2001). Um subproduto do processamento de queijos nos laticínios, caso não seja aproveitado das inúmeras maneiras possíveis, seu descarte na estação de tratamento de efluentes representará custos adicionais para a empresa que o gera. Segundo estudo da FAO - Food Agriculture Organization, o efeito poluidor de 250 mil litros de soro corresponde ao despejo no ambiente do esgoto de uma cidade de 50 mil habitantes (ZACARCHENCO, 2008). Isto pode representar problema ambiental, custos para tratamento de efluentes ou grande quantidade de matéria-prima para fabricar produtos a partir de soro de leite.

Por apresentar elevada carga orgânica, ser produzido em grandes volumes e, principalmente, por ser de difícil biodegradabilidade, o soro de queijo se torna um substrato atraente para utilização em processos fermentativos por microrganismos, devido ao seu alto teor de lactose, representando uma importante fonte de poluição ambiental, sendo o subproduto mais problemático das indústrias de laticínios (ZAFAR e OWAIS, 2006; KOSSEVA, 2009; KOUTINAS, 2009; GUIMARÃES, 2010). Em média, para a fabricação de um quilo de queijo necessita-se de dez litros de leite, recuperando-se nove litros de soro (KOSIKOWSKI, 1979). Adicionado a isso, o soro de queijo representa grandes perdas econômicas para a indústria de laticínios já que aproximadamente metade da produção mundial é disposta em plantas de tratamento de efluente ou utilizada para alimentação animal (RECH e AYUB, 2007).

Entre os nutrientes constituintes mais abundantes no soro encontram-se a lactose (4,5-5,0%*m/v*), proteínas solúveis (0,6-0,8%*m/v*), lipídeos (0,4-0,5%*m/v*) e sais minerais (8-10% do extrato seco). Contendo aproximadamente 6,9% de sólidos

totais, o soro de queijo também é composto por menores quantidades de outros nutrientes tais como o ácido cítrico e vitaminas (SGARBIERI, 1996; SISO, 1996; RICHARDS, 2002). Acrescido a isso, a composição do soro pode variar de acordo com o tipo de queijo fabricado, ou seja, de acordo com o procedimento empregado na precipitação da caseína.

Os componentes hidrossolúveis do leite, tais como lactose, alguns sais, vitaminas e as proteínas que não coagulam com a caseína, como as albuminas e as globulinas, ficam dissolvidos no soro (OLIVEIRA, 1999). Há basicamente dois tipos de soro de lácteo:

- Soro doce – proveniente da coagulação enzimática do leite em pH próximo de 6,7, sendo obtido nos processos de fabricação de queijos tipo Cheddar, Minas frescal, Minas padrão, Mussarela, Prato e Suíço. Sua acidez titulável em ácido láctico é de 0,15 a 0,18%, correspondente a um pH de 6,3 a 6,7 (ORDÓÑEZ, 2007).

- Soro ácido - resultante da produção de caseína ou de queijos com leites coagulados inicialmente por ácido, tal como a do tipo cottage, quark, requeijão e da ricota. Esse tipo de soro apresenta uma acidez titulável de 0,5 a 0,6% em ácido láctico e apresenta pH de 4,6 a 4,7 (ORDÓÑEZ, 2007).

As composições do soro ácido e doce encontram-se descritas na Tabela 2.

Tabela 2 – Composição do soro doce e do soro ácido.

Componente	Soro Doce (%)	Soro Ácido (%)
Água	93-94	94-95
Gordura	0,3-0,5	0,3-0,6
Proteína	0,8-1,0	0,8-1,0
Lactose	4,5-5,0	3,8-4,2
Minerais	0,5-0,7	0,7-0,8
Ácido Láctico	0,1	0,1-0,8

Fonte: Madrid, 1995.

Em consequência do seu pH, o soro deteriora-se rapidamente, em razão da ação microbiana e sua eliminação requer pré-tratamento para evitar a poluição do meio ambiente.

### 2.3.1 Proteínas do soro

O soro de leite pode ser obtido através de três tipos de processamento principais, tais processos influem diretamente em sua qualidade protéica: a) pelo processo de coagulação enzimática (enzima quimosina), resultando no coágulo de caseínas, matéria-prima para a produção de queijos e no soro "doce"; b) precipitação ácida no pH do ponto isoelétrico (pI), resultando na caseína isoelétrica, que é transformada em caseinatos e no soro ácido; c) separação física das micelas de caseína por microfiltração, obtendo-se um concentrado de micelas e as proteínas do soro, na forma de concentrado ou isolado protéico (ZINSLY, 2001).

A relação "caseínas:proteínas do soro" é bastante variável entre as espécies de mamífero. Esta relação é de 80,0:20,0 (%) no leite bovino, de 20,0:80,0 (%) no leite humano, 80,0:20,0 (%) no leite de búfala e 82,2:17,8 (%) no de cabra. Observa-se que no leite humano a proporção de proteínas de soro é 4 vezes a das caseínas, comparadas com as do leite de vaca e de búfala (SGARBIERI, 2005).

Dadas as características geleificantes das proteínas do soro, que poderiam permitir sua incorporação a produtos como queijos ou através de uma microparticulação das mesmas, poder-se-ia favorecer um aumento do valor intrínseco dos produtos das indústrias lácteas (STEVENTON, 1994; GUADIX, 2006; MCCARTHY Y MAEGLI, 1994; RODRIGUEZ PATINO, 2001), ou diminuir gastos através da reutilização do xarope de glicose-galactose produzido pela hidrólise enzimática da lactose ao decorrer do processo industrial (CARRARA, 2003).

Proteínas do soro de leite tem sido muitas vezes consideradas como um ingrediente para melhorar a textura de alimentos devido as suas propriedades nutricionais e funcionais únicas (RABIEY, 2009).

Do ponto de vista aminoacídico (aminoácidos essenciais), as proteínas de soro apresentam quase todos os aminoácidos essenciais em excesso às recomendações, exceto pelos aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina) que não aparecem em excesso, mas atendem às recomendações de ingestão diária para todas as idades. Apresentam elevadas concentrações dos aminoácidos triptofano, cisteína, leucina, isoleucina e lisina (SGARBIERI, 2005).

As proteínas do soro de leite são altamente digeríveis e rapidamente absorvidas pelo organismo, estimulando a síntese de proteínas sanguíneas e

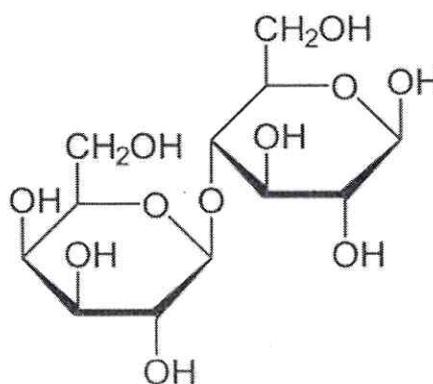
teciduais a tal ponto que alguns pesquisadores as classificaram como proteínas de metabolização rápida “*fast metabolizing proteins*”, muito adequadas para situações de estresses metabólicos em que a reposição de proteínas no organismo se torna emergencial (SGARBIERI, 2005).

### 2.3.2 Lactose

O dissacarídeo lactose é o predominante e mais importante carboidrato do leite, existindo concentrações muito baixas de outros monossacarídeos, incluindo glicose e galactose, oligossacarídeos neutros e ácidos e carboidratos ligados a peptídeos e proteínas. De acordo com Damodaran (2007), a concentração de lactose no leite bovino varia conforme a origem entre 2,0 % a 8,5 % e demais espécies mamíferas, variam de 0-10% (p/p) (FOX, 2011). O leite de vaca contém, corriqueiramente, maior quantidade de lactose do que qualquer outro componente sólido, apresentando uma concentração quase constante entre 45 g.L<sup>-1</sup> a 50 g.L<sup>-1</sup> (WALSTRA & JENNESS, 1984).

A principal forma de lactose (Figura 1) é o anômero  $\alpha$ , que tem uma baixa solubilidade, mas, quando em solução é difícil de cristalizar. Os cristais são monohidratos e, a menos que a cristalização seja cuidadosamente controlada, são grandes o suficiente para ser detectável no palato como areosidade. Estas características criam problemas na fabricação de produtos lácteos, concentrados, desidratados, e congelados (FOX, 2011).

Figura 1. Estrutura química da lactose



Segundo Holsinger (1997), a lactose pode ocorrer em duas formas cristalinas nos produtos lácteos como uma mistura vítrea amorfa de  $\alpha$  e  $\beta$ -lactose. De acordo com o mesmo autor, a forma estrutural da  $\alpha$ -lactose pode ser convertida na forma estrutural beta por meio da mudança na posição da hidroxila e do hidrogênio no grupo redutor. Esta mudança na rotação e a transformação em solução de uma forma na outra é denominada mutarrotação.

A lactose é composta por D-glicose e D-galactose, estando o grupo aldeído da galactose unido ao grupo C-4 da glicose mediante um enlace  $\beta$ -1-4-glicosídico (WALSTRA, 2001). Este enlace pode ser rompido pela ação enzimática. A  $\beta$ -galactosidase hidrolisa a lactose em seus monossacarídeos constituintes, glicose e galactose. Esta conversão é de considerável interesse, do ponto de vista tecnológico, pois os produtos da hidrólise, em combinação, são mais doces, mais solúveis, diretamente fermentados e imediatamente absorvidos no intestino do lactente (MORRISEY, 1985).

Apesar das altas concentrações de lactose no leite e nas glândulas mamárias, baixas concentrações aparecem no sangue e na urina, especialmente durante a gravidez e amamentação (GONZÁLEZ, 2001). A lactose confere ao leite um sabor ligeiramente doce e constitui fonte de carbono para microorganismos, sobretudo leveduras que crescem no leite, visando a produção de biomassa, etanol, ácidos orgânicos, enzimas e extrato de levedura (ORDÓÑEZ, 2007).

A lactose não é tão doce quando comparada a outros açúcares, como sacarose, glicose e frutose e soluções aquosas de sacarose, com concentrações de 1%; 10% e 20% m/v (relação massa por volume), possuem o mesmo poder edulcorante que soluções aquosas de lactose com concentrações respectivas de 3%, 15%; 30% m/v (FINZER, 2011).

Uma restrição deste açúcar é a sua ingestão por pessoas intolerantes à lactose, uma vez que não possuem a enzima necessária para sua hidrólise,  $\beta$ -galactosidase, dificultando o consumo de derivados lácteos. Globalmente, alguns seres humanos adultos secretam  $\beta$ -galactosidase intestinal insuficientemente necessária para o catabolismo de lactose e, conseqüentemente, são intolerantes à lactose na dieta. Vários derivados isentos de lactose podem ser produzidos por via química, enzimática ou métodos microbiológicos (FOX, 2011).

Desta forma, a hidrólise da lactose promove a melhoria da aplicação do soro de queijo, uma vez que a sua conversão em glicose e galactose permite uma melhor aplicação na indústria de alimentos, agregando valor ao soro, o qual transita de rejeito a co-produto.

A hidrólise da lactose do soro de queijo e derivados pode ser realizada por ácido ou tratamento enzimático com  $\beta$ -galactosidase. Segundo HATZINIKOLAOU et al. (2005), o processo de hidrólise ácida requer o uso de ácido de elevada concentração e elevada temperatura, além de promover reações paralelas complexas. Por outro lado, a hidrólise enzimática depende das propriedades da enzima, porém suas condições de operação são mais suaves com relação ao pH e temperatura, quando comparadas ao primeiro método (TOSTES, 2006).

## 2.4 Enzimas

As restrições existentes na obtenção de produtos e intermediários de interesse comercial podem ser associadas aos tipos de catalisadores químicos empregados, que são pouco versáteis e exigem altas temperaturas para atingir razoável velocidade de reação. Além disso, possuindo baixa especificidade, geralmente fornecem produtos de composição química mista, ou produtos contaminados, que requerem uma etapa posterior de purificação (MARCHETTI, 2007; RANGANATHAN., 2008; ANTCZAK, 2009; MENDES, 2011).

As enzimas são macromoléculas que atuam como catalisadores de alta eficiência durante o transcurso das complexas reações bioquímicas que formam parte do metabolismo dos seres vivos. O mercado mundial de enzimas industriais foi estimado em US\$ 2,3 bilhões anuais e atua em três segmentos: enzimas técnicas (destinadas a indústrias de tecidos e de produtos de limpeza), enzimas para alimentos e bebidas e enzimas para ração animal. Diversas enzimas, como, proteases, amilases, lipases, celulasas, xilanases e fitases são utilizadas industrialmente (MUSSATTO, 2007).

Esses biocatalizadores possuem excelentes propriedades tais como elevadas seletividade e especificidade, que lhes permite realizar uma grande variedade de processos químicos sob diversas condições reacionais. Sua função metabólica exerce influência específica sobre certas interações bioquímicas,

usualmente em ambientes muito complexos - como no interior de células - e incluem transformações oxidativas e conjugativas que ocorrem em altas velocidades catalíticas e com reações altamente regioseletivas e estereosseletivas (CARDOSO, 2009). As limitações existentes na obtenção de produtos e intermediários de interesse industrial estão associadas aos tipos de catalisadores químicos empregados, que são pouco versáteis e exigem altas temperaturas para atingir razoável velocidade de reação (MENDES, 2011).

As enzimas apresentam ampla utilização na indústria, dividindo-se em três segmentos: as enzimas destinadas aos setores de alimentos, que são empregadas basicamente na produção de xarope de açúcar invertido e de compostos aromatizantes; as enzimas técnicas, que são utilizadas na formulação de detergentes, produção de papel e celulose, manufatura de couros; e produção de fármacos (MENDES, 2011).

Na indústria de alimentos são utilizadas principalmente em processos de maceração de vegetais e frutas para a produção de néctares e purês, no processamento de produtos cárneos (tenderização), na produção de queijos, na extração e clarificação de sucos de frutas e vinho, na desengomagem de fibras naturais e na recuperação de óleos vegetais (COELHO, 2001). Este é o principal mercado consumidor de enzimas, detendo aproximadamente 50% do total das enzimas comercializadas (MENDES, 2011).

A tecnologia de enzimas é um campo multidisciplinar, e reconhecido pela Organização para a Cooperação Econômica e Desenvolvimento (OCED) como importante componente do desenvolvimento industrial sustentável. Além do campo industrial, o rápido desenvolvimento da engenharia genética, *high-throughput screening* entre outros, abriu novos campos de aplicação. Esse desenvolvimento tem estimulado as indústrias química e farmacêutica a utilizarem a tecnologia de enzimas com interesse concentrado nas áreas da saúde, de energia e do meio ambiente (CARDOSO, 2009).

Diversos estudos com enzimas têm-se intensificado a fim de desenvolver e melhorar a tecnologia enzimática, como na área de alimentos, biocombustíveis, farmacêutica, dentre outras (ADRIANO, 2008a; RODRIGUES, 2008; VIEIRA, 2009; MENDES, 2011; TORRES e BATISTA-VIEIRA; 2012; BEZERRA, 2012).

As enzimas podem ser classificadas de acordo os tipos de reações por elas catalisadas. Essas são divididas em seis classes: oxidorreduções, transferases,

hidrolases, liases, isomerases e ligases (NELSON, 2002). Na Tabela 3 é mostrada a classificação internacional das enzimas baseada nos tipos de reações por ela catalisadas.

Tabela 3 – Classificação internacional das enzimas.

Classe	Tipo de Reação Catalisada
Oxidoredutases	Transferência de elétrons (íons hidretos ou átomos de H).
Transferases	Reações de transferência de grupos.
Hidrolases	Reações de hidrólise (transferência de grupos funcionais para a água).
Liases	Adição de grupos às duplas ligações ou formação de duplas ligações por meio de remoção de grupos.
Isomerases	Transferência de grupos da mesma molécula para formar isômeros.
Ligases	Formação de ligações do tipo C-C, C-S, C-O e C-N por reações de condensação acopladas à quebra de ATP.

Fonte: NELSON, 2002.

A especificidade enzimática baseia-se nas interações entre a molécula do substrato/inibidor e o sítio ativo da enzima, como, por exemplo, as ligações de hidrogênio, as interações de Van der Waals e as interações eletrostáticas. Isto ocorre somente quando várias dessas interações acontecem simultaneamente entre as duas moléculas (enzima e substrato/inibidor) em uma estrutura tridimensional (CARDOSO, 2009).

O elevado desempenho catalítico apresentado por essas proteínas em condições brandas de reação (temperaturas amenas, pH neutros e meio aquoso/orgânico), as torna atraentes para aplicações em processos industriais. Isto possibilita o uso de reduzidas quantidades de enzima no reator em relação ao volume total a processar. Este procedimento permite uma consequente redução de custos fixos e variáveis em relação aos catalisadores químicos tradicionais (SANTOS, 2011). Para Mendes (2011), a grande desvantagem da utilização de enzimas na forma solúvel é a sua separação para posterior aplicação, assim como a contaminação do produto desejado, pois enzimas são compostos solúveis em água.

Para que o processo enzimático se torne mais eficiente em relação ao reuso do catalisador, faz-se necessário o encapsulamento enzimático, mantendo as condições ótimas da enzima, menor interferência de inibidores e maior estabilidade operacional (SANTOS, 2011). Desta forma, técnicas de imobilização têm sido empregadas com o objetivo de reutilizar as enzimas. Esta estratégia também é uma importante ferramenta para estabilizar e reduzir a inativação por distorção da sua estrutura nativa por influência da temperatura, pH e de solventes orgânicos, o que pode ser atrativo para a aplicação de enzimas no setor industrial (MENDES, 2011).

#### **2.4.1 Neutrase**

Proteases (EC 3.4.21-24) representam um dos maiores grupos de enzimas industriais com demanda crescente do mercado, devido à suas aplicações na indústria, na biotecnologia, na medicina e em outras áreas de pesquisa. Hoje em dia, proteases brutas são comercialmente disponíveis e amplamente utilizadas na indústria de alimentos para preparar hidrolisados proteicos com propriedades nutricionais e funcionais amplamente melhoradas (VIOQUE, 2000).

Neutrase®, uma endoprotease bacteriana produzida por *Bacillus subtilis* apresenta um interesse considerável devido a uma grande variedade de aplicações possíveis, por exemplo, na produção de proteínas para alimentos funcionais, na hidrólise de feijão (LI, 2005), de glúten de milho (APAR, 2007), da proteína do soro de queijo (SHIN, 2007), da tilápia (RAGHAVAN, 2008), e de soja (BAO, 2008), para a melhoria da textura e propriedades sensoriais de laticínios (KUMAR, 2000), na síntese de peptídeos em meio orgânico (CLAPE´S, 1997), como hidrolisados de proteínas com baixo teor de fenilalanina que são importantes para a indústria química e indústrias farmacêuticas. Além disso, a neutrase pode ser utilizada como uma fonte potencializadora de atividade antioxidantes de origem natural e ampliar a informação sobre o mecanismo de seu efeito antioxidante (DRYÁKOVÁ, 2010) e anti-inflamatório (SENEVIRATHNE, 2010).

Ou *et al.* (2010) estudaram os efeitos dos hidrolisados de proteínas de soro de leite concentrado (WPC) por neutrase na absorção de ferro, utilizando a digestão

in vitro, aumentando significativamente a absorção do mineral, para 12,8%, em comparação a 3,8% no controle, onde outras enzimas, como a alcalase, apresentaram resultados negativos. Peptídeos inferiores a 10 kDa e ácido aspártico, serina, ácido glutâmico, glicina, cisteína, histidina, prolina podem ser contribuintes para esta melhoria.

Vijaya *et al.* (2002) avaliaram o efeito da hidrólise enzimática de leite usando neutrase no crescimento de cepas probióticas de *Bifidobacterium bifidus*, observando uma considerável alta na taxa de crescimento desta cepa. Um aumento de aproximadamente 60% de melhoria da viscosidade, bem como um aumento de produção de compostos voláteis que melhorou o flavor do produto, quando utilizado leite hidrolisado pela neutrase em comparação ao controle que não passou pelo processo de hidrólise.

Zhang *et al.* (2010) utilizaram neutrase para a produção de peptídeos antioxidantes de alta qualidade a partir da proteína de endosperma de arroz desengordurado, inibindo significativamente a oxidação lipídica, em um sistema de emulsão de ácido linoleico mais eficazmente do que  $\alpha$ -tocoferol, e aumentou a viabilidade de t-BHP a citotoxicidade induzida até 74,38% (para células MRC-5) e 78,39% (por RAW264.7) a 80  $\mu$ g/mL.

As condições da manipulação de reações de hidrólise podem ser utilizadas, em certa medida, para definir as características dos hidrolisados finais. No entanto, há especificidade das enzimas que são usadas para determinar o tipo de peptídeo produzido e, conseqüentemente, as propriedades da proteína específicas do alimento hidrolisado (SMITH, 1998).

#### **2.4.2 L-arabinose isomerase**

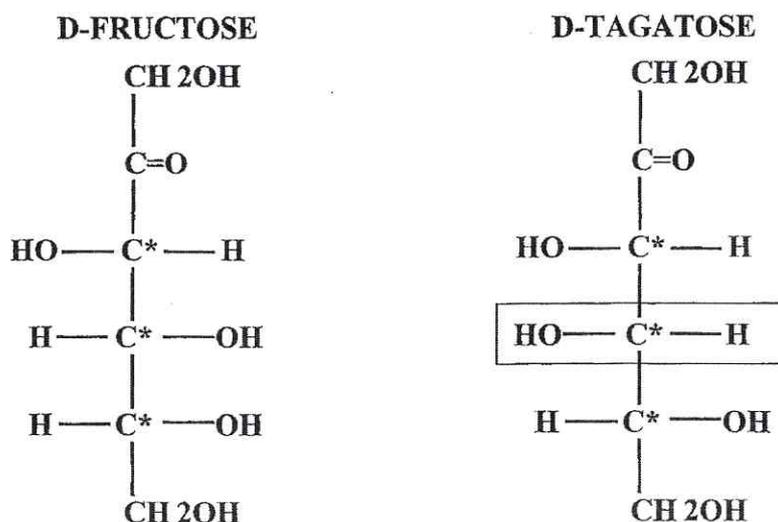
A enzima L-arabinose isomerase (EC 5.3.1.4) catalisa a isomerização in vivo da L-arabinose em L-ribulose e in vitro de D-galactose em D-tagatose. Esta enzima é de interesse industrial, devido ao seu potencial aplicação na produção de D-

tagatose. Atualmente, vários microrganismos foram relatados, documentados ou patenteados como fontes desta enzima (MANZO, 2011).

A D-tagatose é um monossacarídeo enantiômero da D-frutose (inversão em C-4) (Figura 3). Foi proposto para utilização como um edulcorante alternativo porque tem um valor energético reduzido de baixas calorias (1,5 kcal/g) (PATRA, 2009), não tem efeitos glicêmicos e insulinêmicos (ZHANG, 2007). Ocorre naturalmente em pequenas quantidades em goma produzidos pela árvore *Sterculia setigera*, bem como pequenas quantidades em diversos alimentos tratados termicamente como o leite bovino em pó, esterilizado, chocolate quente, que é formada a partir de D-galactose por isomerização. É também encontrada numa variedade de queijos, iogurtes e outros produtos lácteos (MENDOZA, 2005). Tem muitos efeitos benéficos para a saúde, entre as quais podemos citar: promotoras de perda de peso (MOORE, 2006); o efeito da glicemia nulo (DONNER, 1999); reconhecida ação prebiótica na prevenção da formação da placa dentária e de biofilme de microrganismos (WONG, 2000); regulação da flora intestinal e melhoria da gravidez e desenvolvimento fetal e redução dos sintomas de diabetes tipo 2 (XU, 2011). Além disso, possuem efeito crioprotetor antioxidante e, por conseguinte, têm sido utilizados como agente de estabilização e transporte de órgãos a serem transplantados (PATERNA, 1998).

Enquanto a lactose tem sido muito utilizada como um aditivo na indústria de alimentos, o seu uso sempre foi limitado, devido à sua baixa solubilidade e baixa doçura, além de uma boa parte da população mundial ser intolerante a este açúcar. Uma possibilidade industrialmente viável para o uso de soro de leite é o desenvolvimento de compostos de elevado valor a partir de lactose. Neste sentido, a D-tagatose é considerada como um dos derivados com mais possibilidades para o desenvolvimento do mercado em longo prazo (MANZO, 2011).

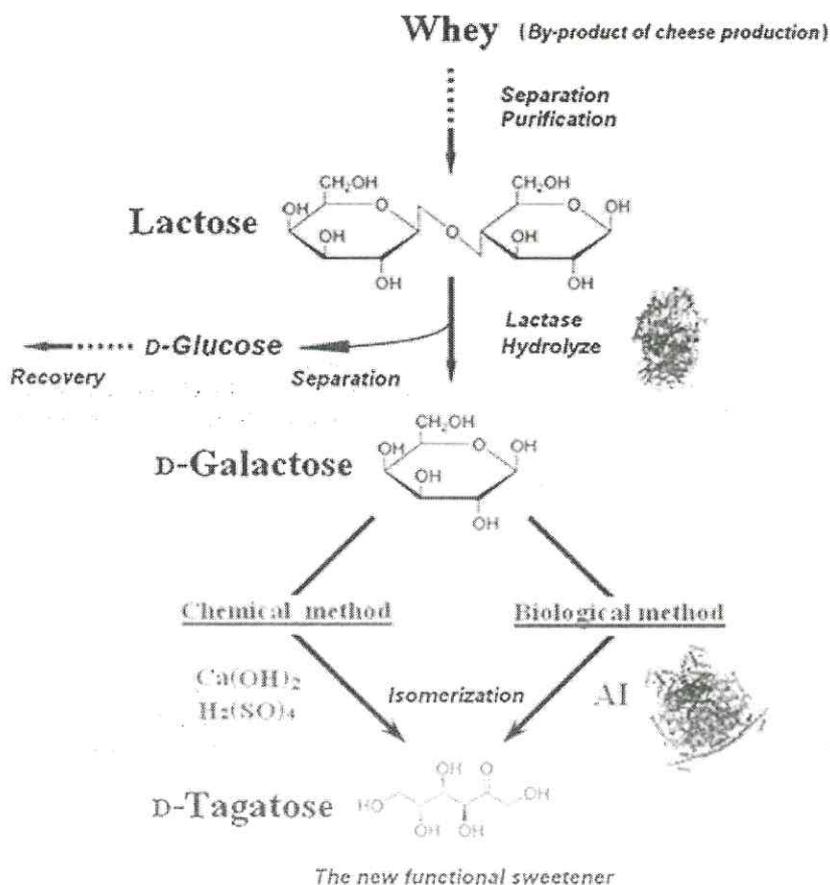
Figura 2. O quarto carbono quiral em imagem-espelho da D-frutose. \*Carbono quiral.



Fonte: VASTENAVOND, 2012

Industrialmente, a D-tagatose é produzida quimicamente a partir de D-galactose, que é isomerizada para a D-tagatose, em condições alcalinas (pH 12) utilizando hidróxido de cálcio como um agente de complexação. Altera equilíbrio do hidróxido de cálcio na isomerização entre D-galactose e D-tagatose, favorecendo a formação de D-tagatose, uma vez que forma um complexo insolúvel com esse açúcar a pH elevado. Tratar o resíduo com dióxido de carbono libera a D-tagatose por neutralização da mistura e precipitação de cálcio como carbonato de cálcio. A desvantagem deste processo é que todos os produtos químicos de isomerização não são específicos e, portanto, conduz à formação de subprodutos indesejáveis, aromas e resíduos químicos. Além disso, através desta via tem sido demonstrado uma doçura reduzida de D-tagatose. Enquanto isso, o processo enzimático tem vantagens na utilização de condições de temperatura e pH mais suave, além de não formar produtos secundários, o que indica que a reação de isomerização através da L-arabinose isomerase (L-AI), sendo uma enzima altamente específica (KIM, 2004), conforme demonstrado na Figura 4 (XU, 2012).

Figura 3. Diagrama esquemático do processo de produção de D-tagatose da indústria. D-tagatose poderia ser fabricado por meio de métodos químicos e biológicos, seletivamente utilizando soro de leite ou lactose como os materiais de partida.



Fonte: XU, 2012.

Atualmente, vários grupos de pesquisa estão estudando isomerização enzimática extensivamente utilizando a enzima L-AI, mas nenhum método enzimático ainda desenvolvido para a produção industrial desta cetohexose. No entanto, a obtenção de D-tagatose por meio biológico tem certas vantagens em relação aos processos químicos tais como a utilização de condições reacionais mais suaves, a produção de D-tagatose sem gerar subprodutos indesejáveis, bem como a possibilidade de reciclar o D-galactose durante a purificação (KIM E OH, 2005).

Finalmente, a D-tagatose tem sido utilizado como intermediário na síntese de outros compostos orgânicos oticamente ativos, sendo também usados como um aditivo detergente em formulações cosméticas e farmacêuticas. Com base nestas propriedades, D-tagatose além de ter atraído uma grande atenção nos últimos anos como um adoçante de baixa caloria em substituição ao açúcar, também foi aprovada

como "geralmente reconhecido como seguro (GRAS)" sob os regulamentos da FDA (MANZO, 2011), portanto pode ser utilizada na indústria de alimentos.

## 2.5 Imobilização Enzimática

O elevado custo de enzimas e sua baixa estabilidade frente à temperatura e pH, fazem da estratégia de imobilização em suportes sólidos uma grande vantagem na aplicação destas em inúmeros processos.

Enzimas imobilizadas são definidas como enzimas que estão fisicamente confinadas ou localizadas numa certa região do espaço, com retenção de sua atividade catalítica e que pode ser utilizada repetida e continuamente. Enzimas imobilizadas incluem: Enzimas modificadas a uma forma insolúvel em água por técnicas adequadas; Enzimas solúveis isoladas em reatores equipados com membranas de ultrafiltração não permeáveis, que retêm as moléculas enzimáticas dentro do reator, ou Enzimas cuja mobilidade foi restringida por ligações a outras macromoléculas e nanopartículas, sendo o composto resultante insolúvel em água. Imobilização é um termo genérico empregado para descrever a retenção de uma biomolécula no interior de um reator ou de um sistema analítico (CARDOSO, 2009).

A imobilização de enzimas em suportes sólidos reduz o custo de processos enzimáticos porque permitem o reuso da enzima (catalizador de elevado custo), pois facilita a separação da enzima do meio reacional. Além disso, a imobilização pode promover estabilização da enzima quando comparada à sua forma nativa, reduzindo sua degradação a variações de temperatura e pH.

Apesar da grande diversidade de métodos desenvolvidos e aplicados na imobilização de enzimas, não há um método aplicável para todas as enzimas. Portanto, para cada aplicação de uma enzima imobilizada é necessário escolher o procedimento mais simples e mais barato e que resulte em um derivado com boa retenção de atividade e alta estabilidade operacional (MENDES, 2011).

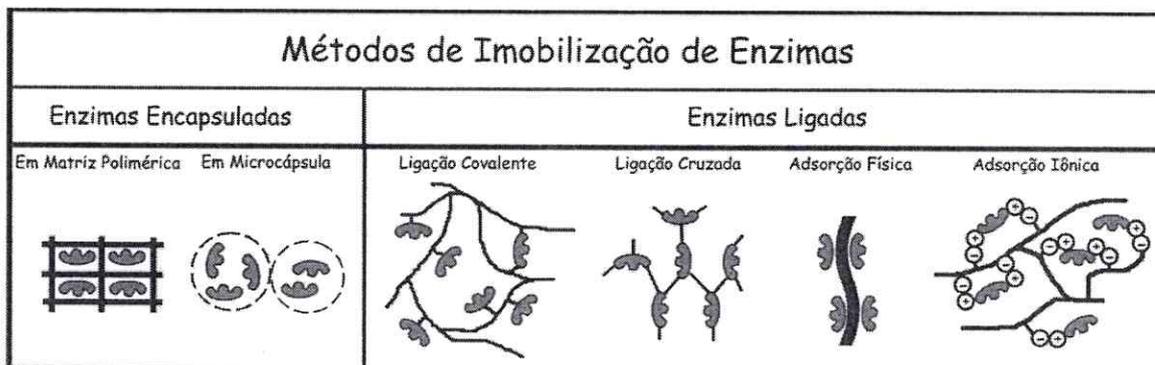
A escolha do suporte para imobilização de enzimas depende de várias características que são importantes em sua aplicação em processos industriais, tais como: resistência mecânica e microbiana, estabilidade térmica, funcionalidade

química, caráter hidrofóbico ou hidrofílico, facilidade de regeneração, morfologia (superfície de contato e porosidade) e custo.

Quando se desenvolve um biocatalisador contendo enzima imobilizada, as características mais desejáveis são elevadas estabilidade operacional e eficiência catalítica. A estabilidade operacional é uma avaliação da perda de atividade do biocatalisador em bateladas consecutivas da reação de interesse e depende de uma série de fatores, tais como, desprendimento da enzima do suporte, obstrução dos poros por impurezas ou produtos secundários e perda de suporte por atrito ou dissolução (SOARES, 2000). A eficiência catalítica é a razão entre as unidades de atividade enzimática, medida no suporte após imobilização da enzima, e as unidades de atividade oferecidas ao mesmo. Baixos valores de eficiência catalítica podem estar relacionados à mudanças conformacionais na enzima durante a imobilização ou à propriedades físicas e químicas do suporte, as quais podem mudar a afinidade da enzima pelo substrato e torná-la menos acessível para o mesmo. A eficiência catalítica pode também ser seriamente diminuída por causa de restrições difusionais, as quais são limitações comuns em biocatalisadores insolúveis (BLANCO et al., 2004).

Os vários métodos de imobilização empregados baseiam-se nas ligações físicas e químicas entre a biomolécula e o suporte. Os mais utilizados são: adsorção física (interações hidrofóbicas e de Van der Waals) e química (ligação covalente e iônica), imobilização por confinamento em matriz ou microcápsula e ligação cruzada. Esses métodos são sumarizados na Figura 5 (CARDOSO et al., 2009).

Figura 4. Principais métodos de imobilização de enzimas.



Fonte: CARDOSO, 2009.

A imobilização de enzimas pode ser feita *in batch* ou *in situ*. No processo *in batch*, a enzima é primeiramente imobilizada sobre o suporte cromatográfico e, em seguida, empacotada na coluna. Já no processo *in situ*, a enzima é imobilizada diretamente na coluna previamente empacotada. Alguns estudos de comparação entre os dois modos na imobilização da *Penicillium* G-acilase (PGA), utilizando vários suportes derivados de sílica, demonstraram que os melhores resultados em termos de quantidade de PGA ligada foram obtidos pela técnica *in situ*. Observou-se, ainda, que durante o processo *in batch* a atividade catalítica pode ser diminuída (CALLERI, 2004).

A **imobilização por encapsulação** pode ser obtida pelo envolvimento das enzimas por membranas semipermeáveis, ou por micelas reversas formadas por surfactantes. As enzimas permanecem livres em solução, mas em um espaço restrito (CARDOSO, 2009). Consiste na retenção física da enzima nas cavidades internas de uma matriz sólida porosa constituída geralmente por polímeros entrecruzados como poliacrilamida, gelatina, alginato, carragenana, resinas de poliuretano e silanos. As principais vantagens da encapsulação de enzimas referem-se à grande área superficial para contato do substrato e da enzima no interior de um volume relativamente pequeno, e à possibilidade de imobilização simultânea de diferentes enzimas em uma única etapa. Como principais desvantagens, têm-se: a restrição de que os biocatalisadores podem ser aplicados somente com substratos de baixa massa molecular; a possível inativação da enzima durante o procedimento

de imobilização; a alta concentração de enzima necessária para garantir a encapsulação e, os possíveis efeitos de difusão de substratos e/ou produtos no interior da matriz porosa (MENDES, 2011).

A **imobilização por ligação covalente** baseia-se na ativação de suportes com a inserção de grupos reativos que reagem com os grupos nucleofílicos da enzima. Para Cardoso (2009), envolve a formação de ligações covalentes entre os grupos funcionais presentes na superfície do suporte e os grupos funcionais dos resíduos de aminoácidos da enzima [(NH<sub>2</sub>) da lisina e arginina, o CO<sub>2</sub>H do ácido aspártico ou glutâmico, o (OH) da serina ou tionina e o grupo (SH) da cisteína]. Nesse procedimento estão envolvidas duas etapas químicas: na primeira, os grupos funcionais do suporte (aminoalquila, aminoarila, 3-glicidoxipropil-carboxila, etc) são ativados por reagentes específicos como, por exemplo, o glutaraldeído, que introduz um grupo carbonila, susceptível a reações com os grupos nucleofílicos da enzima. No caso de formação de bases de Schiff, estas são reduzidas, quando necessário, utilizando-se reagentes, como o cianoboroidreto de sódio, o tetraidroborato de sódio ou o boroidreto de sódio.

Os grupos imino presentes em suportes aminopropilados também podem ser eliminados utilizando-se carbonato de N-N'-disuccinimidila (DSC) ou do suberato de N-N'-disuccinimidila (DSS) como agentes ativadores ou, ainda, pela introdução de cadeias carbônicas longas entre o suporte aminopropilado e a enzima a fim de aumentar a hidrofobicidade do reator com a enzima imobilizada (CARDOSO, 2009).

O grupo carboxila introduzido à superfície do suporte através dos reagentes é altamente susceptível a reações com os grupos nucleofílicos da enzima, favorecendo a reação. O processo de silanização é realizado para introduzir um espaçador entre a enzima e o suporte. Uma solução de 3-aminopropiltriétoxissilano (APTS), ou outro reagente silanizante, reage com os grupos hidroxilas ou silanóis do suporte. Os grupos aminopropila servem, então, para a imobilização da enzima (CARDOSO, 2009).

A **imobilização por ligação cruzada** é livre de suporte, e as enzimas estão ligadas umas às outras, ou a proteínas inativas (gelatina, albumina), formando uma estrutura tridimensional complexa. Pode ser obtida via métodos físicos ou químicos. Quando obtidas por métodos químicos são resultantes das ligações covalentes entre

as enzimas e são favorecidas pelo uso de agentes bi- ou multifuncionais. Como desvantagens do método estão a baixa retenção da atividade e a baixa estabilidade mecânica, que dificulta sua aplicação industrial, além de pouca reprodutibilidade. Como alternativas ao método convencional foram desenvolvidos os métodos por ligação cruzada utilizando enzimas cristalinas (CLEC - *cross-linked enzymes crystals*) e o método de formação de agregados físicos, por precipitação, e subsequente entecruzamento (CLEAs - *cross-linked enzyme aggregates*) das enzimas do agregado (SHELDON, 2012). Para o autor, o uso dos CLEAs tem atraído a atenção, por sua simplicidade, extensa aplicação, alta estabilidade e preservação da atividade.

Na **imobilização por adsorção física** a enzima fica retida na superfície do suporte insolúvel que se encontra em meio aquoso, através de interações de Van der Waals, interações hidrofóbicas, ligações de hidrogênio e interações específicas (CARDOSO, 2009). As principais vantagens deste processo de imobilização são a facilidade e a simplicidade do processo e, além disso, a estrutura conformacional da enzima é pouco alterada. A grande desvantagem é a dessorção da enzima devido às variações de temperatura, pH e força iônica (MENDES, 2011).

Na **imobilização por adsorção iônica**, a enzima se une ao suporte através de atrações eletrostáticas estabelecidas entre as cargas opostas presentes, tanto na superfície do suporte, quanto da enzima. Essa união é mais efetiva que a adsorção física, mas é inferior quando comparada com outros métodos.

## 2.6 Suportes de Imobilização

Durante o desenvolvimento de um protocolo de imobilização, além da escolha da técnica de imobilização a ser utilizada, deve-se atentar para escolha do suporte. A maior contribuição para o bom desempenho da enzima imobilizada é dada pelo suporte. Se de um lado um suporte criteriosamente selecionado pode aumentar o tempo de meia-vida da enzima imobilizada, de outro uma escolha imprudente pode afetar adversamente não só a estabilidade térmica, mas o desempenho global do sistema (CARDOSO et al., 2009).

Segundo Villeneuve (2000) e Freitas (2007), na seleção de um suporte para uma determinada aplicação, devem ser analisadas suas propriedades físicas e químicas, bem como a possibilidade de regeneração do material. As principais características a serem observadas na seleção de um suporte para uma determinada aplicação são: área superficial, permeabilidade, insolubilidade, capacidade de regeneração, morfologia e composição, natureza hidrofílica ou hidrofóbica, resistência ao ataque microbiano, resistência mecânica e custo, dentre outras. Eles podem ser classificados como orgânicos e inorgânicos, e conforme sua morfologia em materiais porosos, não porosos e de estrutura de gel.

Os materiais orgânicos, notadamente os polímeros que podem ser naturais ou sintéticos, são uma classe de suportes amplamente empregados na imobilização de enzimas (LOPEZ-GALLEGO, 2005). Os sintéticos exibem variedades de formas físicas e estruturas químicas que podem ser combinadas para formar um suporte ideal, porém os naturais apresentam algumas vantagens quando comparados aos sintéticos, pois geralmente apresentam baixo custo e são facilmente degradados, não causando danos ao meio ambiente (DALLA-VECCHIA, 2004).

Alguns exemplos podem ser encontrados na literatura, como o uso de casca de arroz na imobilização de invertase (D'SOUZA E GODBOLE, 2002) e palha de arroz na imobilização de lipase (CASTRO et al., 2001). O uso destes resíduos vem, além de gerar um produto de alto valor agregado, reduzir os custos de produção de enzimas imobilizadas.

### ***2.6.1 Fibra da casca do coco verde***

Um grave problema enfrentado pelo segmento da cadeia de produção de coco é a grande produção de resíduos. Cerca de 80% do lixo coletado na orla marítima corresponde a casca do coco verde, consumido "in natura". Já nas indústrias que processam água de coco, aproximadamente 85% de toda a matéria-prima (coco verde) que entra, sai na forma de lixo. Atualmente, este material é enterrado em lixões e aterros, representando um adicional de custo, já que estas indústrias incluem-se nos chamados grandes geradores, devendo se responsabilizar pela coleta do material residual. Ademais, a expansão das agroindústrias

processadoras de água de coco representa um adicional significativo de geração de lixo, o que causa um problema ambiental, especialmente em grandes centros urbanos que devem dispor adequadamente os resíduos gerados (PASSOS, 2005). Como resposta a esta demanda sócio-ambiental, algumas formas de aproveitamento deste resíduo vem sendo estudadas. Os estudos de aproveitamento da casca de coco verde e seus derivados (endocarpo, fibra e pó) variam desde sua aplicação agrônômica até a utilização em processos biotecnológicos. Contudo, apesar destes estudos, novos esforços por geração de mais alternativas são necessários a fim de que tal resíduo, atualmente produzido em grandes quantidades, possa ter outro destino senão os aterros e lixões.

Tal ação, além de contribuir para o desenvolvimento sustentável do País, contribuirá para solução de um problema ambiental vivenciado por cidades cuja produção de casca de coco é grande, impedindo assim que seus aterros e lixões tenham sua vida útil reduzida pela presença de grandes quantidades deste resíduo (BRÍGIDA, 2006).

Estudos de alternativas de aproveitamento de outros resíduos agroindustriais em processos biotecnológicos levaram à utilização de casca de coco verde na obtenção de produtos de alto valor agregado. No Brasil, o coqueiro é cultivado predominantemente no litoral da Região Nordeste, representando 95% da área colhida e 79% da produção brasileira (CUENCA, 2002). Há um grande crescimento observado na última década e tal fenômeno se deu devido à elevação da demanda de coco no mercado e ao desenvolvimento de híbridos com maior produtividade (IBGE, 2012a).

Seguindo esta linha, muitos estudos que vislumbram o reaproveitamento de fibra de casca de coco verde tem fortalecido a preocupação não somente com impactos ambientais, bem como econômicos e sociais.

Uma das alternativas para a casca de coco verde poderia ser o seu aproveitamento em processos fermentativos, como a produção de enzimas. Como a maioria dos rejeitos agroindustriais, este material contém grande quantidade de compostos como celulose, hemicelulose, pectina e outros, não havendo necessidade de grandes complementações nutricionais para o adequado desenvolvimento microbiano. Estes compostos funcionam como indutores para a

produção de enzimas extracelulares, tais como celulasas, xilanases, pectinases e outras (COELHO, 2001). De modo geral, estes resíduos agroindustriais vêm sendo progressivamente utilizados como alternativa para minimizar o impacto ambiental por eles provocado (CORREIA, 2003).

Como outra alternativa, estudos têm demonstrado a eficiência da aplicação deste material como suporte para imobilização de enzimas, agregando valor ao resíduo agroindustrial. Uma outra vantagem acerca do uso desta matéria-prima como suporte é a sua vasta fonte na região Nordeste brasileira e assim redução dos custos do processo de produção de biocatalisadores (BRÍGIDA, 2006; CHINELATE, 2010; BRÍGIDA, 2010; BEZERRA, 2012).

Portanto, ciente desta demanda sócio-ambiental de aproveitamento da casca de coco verde e considerando que materiais lignocelulósicos são bastante utilizados como sorventes (HARTUNG, 2001; RAMÍREZ-LÓPEZ, 2003), sendo empregado inclusive na imobilização de enzimas (D'SOUZA E GODBOLE, 2002; DEY, 2002; GOMES, 2005), este material foi utilizado para imobilizações em estudo.

### **2.6.2 Bagaço de Caju**

De acordo com a *Food and Agriculture Organization* (FAO), o Brasil é o quarto maior produtor mundial de caju com 1,6 milhões de toneladas, atrás de Índia (4 milhões), Nigéria (5 milhões) e Vietnã (8,4 milhões), (PINHEIRO, 2008). No Brasil, a agroindústria do caju no Nordeste desempenha importante função em termos de geração de emprego e renda e o estado do Ceará é o principal estado produtor deste fruto (PACHECO, 2009).

O bagaço do caju, resíduo proveniente da industrialização do pedúnculo de caju para produção de suco, representa cerca de 40% (m/m) do peso total do pseudofruto, que por sua vez não apresenta valor comercial sendo geralmente rejeitado pela indústria local (FERREIRA, 2004; MATIAS, 2005).

O bagaço de caju, como rejeito industrial, vem sendo pesquisado na condição de suporte para imobilização tanto de enzimas (CHINELATE, 2010; SANTOS, 2011; BEZERRA, 2012) como também de microorganismos (PACHECO,

2009; GONDIM, 2010), necessitando-se de proceder um tratamento com ácido e básico para remoção das frações de hemi-celulose e lignina, respectivamente.

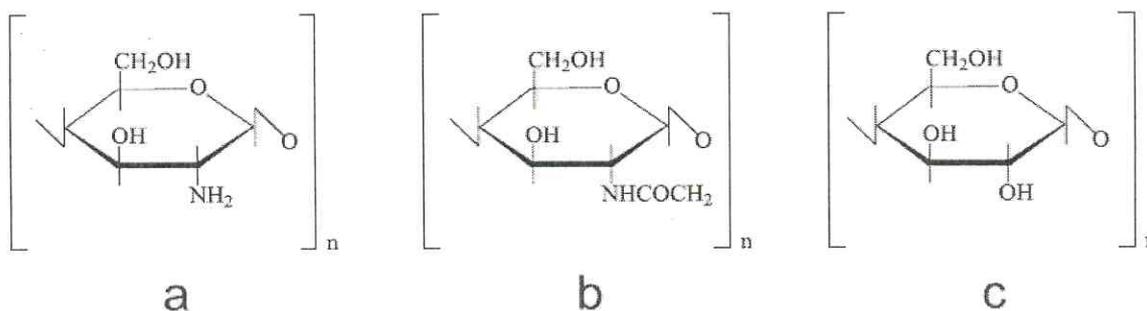
### **2.6.3 Quitosana**

Dentre os diferentes suportes orgânicos naturais empregados na imobilização de enzimas, destaca-se a quitosana. A aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas se deve às suas diferentes configurações geométricas como pó, escamas, hidrogéis, membranas, fibras e outras, além da presença de diferentes grupos funcionais, como hidroxila e amino, que permitem a utilização de diferentes métodos de imobilização.

A quitosana (Figura 6a) é um polissacarídeo linear de origem na desacetilação da quitina (Figura 6b), um dos polímeros mais abundante na natureza, depois da celulose (Figura 6c) (KUMAR, 2000; TSIGOS, 2000). As carapaças de crustáceos são resíduos abundantes e rejeitados pela indústria pesqueira que, em muitos casos, as consideram poluentes. Sua utilização reduz o impacto ambiental causado pelo acúmulo nos locais onde é gerado ou estocado. Este biopolímero possui uma estrutura molecular quimicamente similar à da celulose, diferenciando-se somente nos grupos funcionais (KRAJEWSKA, 2004). Grupos hidroxilas (OH) estão presentes na estrutura geral desses biopolímeros, mas a principal diferença entre eles é a presença de grupos amino ( $\text{NH}_2$ ) na estrutura da quitosana. Este biopolímero é solúvel em meio ácido diluído, formando um polímero catiônico, com a protonação do grupo amino gerando o íon  $\text{NH}_3^+$ , que confere propriedades especiais diferenciadas em relação, por exemplo, às fibras vegetais (BERGER, 2004).

As propriedades físicas e químicas da quitosana são em função do grau médio de desacetilação e da massa molar média. Na presença de soluções diluídas de ácidos, a quitosana se comporta como um polieletrólito catiônico, constituído de copolímeros de 2-amino-2-desoxi-D-glicopirranose e 2-acetamido-2-desoxi-D-glicopirranose de composição variável em função do grau médio de acetilação. A quitosana é insolúvel em água, mas se dissolve em soluções aquosas de ácidos orgânicos, como acético, fórmico, cítrico, além de ácidos inorgânicos como ácido clorídrico, resultando em soluções viscosas (MENDES, 2011).

Figura 5. Estrutura dos biopolímeros quitosana (a), quitina (b) e celulose (c).



Fonte: MENDES, 2011.

De acordo com Adriano (2008b) e Mendes (2011), a quitosana é um dos principais compostos empregados na síntese de hidrogéis, juntamente com outros polímeros como alginato, carragenana, álcool polivinílico, gelatina e outros. Hidrogéis são estruturas poliméricas tridimensionais capazes de adsorverem grandes quantidades de água ou fluidos biológicos. Estas matrizes são insolúveis em água devido à presença de pontos de reticulação química ou física (BERGER, 2004). Este fato se deve aos grupos ionizáveis presentes na estrutura dos biopolímeros como os grupos amino, carboxilatos, sulfatos e hidroxilas que possuem afinidade com a molécula de água.

O emprego de quitosana como suporte em imobilizações torna-se uma opção atrativa, por apresentar uma maior afinidade por proteínas que sua precursora e por apresentar um maior número de grupos aminas livres reativos em sua molécula (HIRANO, 1996). No entanto, a maior quantidade de grupos aminas livres reativos e, sobretudo, o menor teor de grupos N-acetil (<40%), também confere maior solubilidade à quitosana em soluções com pH abaixo de 6,5. Essa propriedade não é desejável, uma vez que diversos meios de produção industrial possuem pHs baixos e a insolubilidade do suporte é uma condição imprescindível para o sucesso da aplicação da enzima imobilizada. Nestes casos, uma das mais interessantes características da quitosana é sua versatilidade para modificações químicas. A presença de grupos amino propicia inúmeras modificações químicas da superfície do polímero. A dissolução de tripolifosfato de sódio ( $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$ ) em uma solução de quitosana induz uma reticulação iônica entre os íons tripolifosfato (TPP) e os grupos

amino protonados da quitosana (KRAJEWSKA, 2004), prevenindo assim, que o polímero seja dissolvido em meio ácido, além de adicionar grupos fosfatos (LAUS, 2006).

Diante disto, o aproveitamento destes materiais na utilização como suportes serão pesquisados neste trabalho na efetiva imobilização das enzimas neutrase e l-arabinose isomerase para a produção de biocatalisadores, baseado na sua ampla disponibilidade.

## **2.7 Modificação Química dos Suportes**

Dado que o desejado é a interação enzima-suporte, a escolha dos grupos reativos na enzima deve recair sobre os grupos amino terminais ou grupos lisina residuais devido a sua reatividade. A maioria das proteínas apresenta alguns resíduos de lisina os quais geralmente não estão envolvidos no sítio ativo da enzima. Grupos amino são polares e estes ficam geralmente expostos para o meio na superfície da proteína e, quando desprotonados, são muito reativos e, mesmo sem prévia ativação, atuam como agente nucleofílico contra átomos com carga parcial positiva localizada na superfície do suporte. (ADRIANO, 2008b).

O método de ativação do suporte mais adequado deve ser aquele que produza grupos aldeídos moderadamente afastados do suporte para evitar impedimento estérico. A principal vantagem de se utilizar grupos aldeídos deve-se à reversibilidade da ligação amino-aldeído, que facilita a imobilização da enzima sem causar importantes distorções na estrutura protéica, enquanto reagem reversivelmente com grupos amino da enzima (ADRIANO, 2008b).

Os grupos aminos podem reagir com vários grupos laterais das proteínas, como hidroxila, carbonila, amino e sulfidril. Sua característica é a alta reatividade dos grupos aldeídicos com aminas primárias inclusive a pH inferiores a dos grupos aminos da enzima. Estes grupos são capazes de imobilizar proteínas através de bases de Schiff em uma larga faixa de condições (baixas temperaturas e curto tempo de contato enzima-suporte), inclusive utilizando suportes com baixo grau de ativação (CARDIAS, 1999).

A ativação de suportes via epóxidos (glicidol e epicloridrina) de um modo geral se dá em duas etapas: na primeira ocorre a esterificação do suporte com o epóxido, resultando em grupos gliceril, e na segunda a oxidação com periodato de sódio, de onde resultam grupos aldeído, entretanto com epicloridrina, são gerados também grupos oxirano (ADRIANO, 2008b). Para o mesmo autor, os grupos epóxidos são muito estáveis e, por isso, a obtenção de suportes contendo uma elevada densidade de tais grupos é absolutamente factível. Estes suportes podem ser ativados com uma densa camada de grupos reativos.

O glutaraldeído é o dialdeído mais popular empregado para a ativação de suportes para imobilizar enzimas (GUISAN, 2006) e tem sido extensivamente citado como agente ativador de matrizes para imobilização de enzimas e proteínas. Apesar de sua reação com grupos amino primários para promover reticulação covalente ter sido explorada em várias circunstâncias, o mecanismo preciso dessa reação e a estrutura dos componentes químicos formados não foram ainda conhecidos em detalhe.

No caso da quitosana, por exemplo, esta modificação química, tem como objetivo aumentar a resistência mecânica, alterar a hidrofobicidade, biocompatibilidade e estabilidade química tornando-a mais resistente (VIEIRA, 2004). Para ativação de diversos suportes, vários agentes bifuncionais têm sido utilizados como por exemplo: epicloridrina, glutaraldeído, glicidol (ADRIANO, 2008a; RODRIGUES, 2008; MENDES, 2011, BEZERRA, 2012). Glutaraldeído reage com aminos da quitosana e conseqüentemente, esses grupos ficam disponíveis em menor quantidade para a formação de complexos e sua capacidade de adsorção diminui (MATEO, 2006). Embora, glutaraldeído continue sendo o mais barato e versátil, uma vez que usando baixa força iônica, a natureza catiônica da superfície permite a rápida imobilização iônica das proteínas, algumas enzimas são inativadas por este reagente, muito provavelmente, por conta dos resíduos do sítio ativo ser modificado (GUISAN, 2006).

---

*Referências Bibliográficas*

---

ADRIANO, W. S.; Mendonça, D. B.; Rodrigues, D. S.; Mammarella, E. J.; Giordano, R. L. C. **Improving the Properties of Chitosan as Support for the Covalent Multipoint Immobilization of Chymotrypsin.** *Biomacromolecules*, 9, 2170, 2008. (a)

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

ALMEIDA, E.S.; CABALLERO, N.D.. **Tratamento do efluente da indústria de queijos por processos biológicos e químicos.** Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, *Tese de Doutorado*. Instituto de Química, Dezembro de 2004.

ALVES, R.L.D.; MARTINS, D.D.S. **Projeto da Rede de Captação Logística do Soro de Queijo Produzido no Estado de Minas Gerais.** *Dissertação de mestrado*. Universidade Federal de Viçosa - UFV, 2005.

ANTCZAK, M. S.; KUBIAK, A.; ANTCZAK, T; BIELECKI, S. **Enzymatic biodiesel synthesis - key factors affecting efficiency of the process.** *Renewable Energy*, v. 34, p. 1185-1194, 2009.

ANTUNES, A.J. **Funcionalidades de proteínas do soro de leite bovino.** Barueri-SP: Manole, 2003.

APAR, D. K.; O'zbek, B. **Hydrolysis and solubilisation of corn gluten by Neutrase.** *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 82, 1107–1114, 2007.

ASRAF, S. S.; GUNASEKARAN, P. **Current trends of  $\beta$ -galactosidase research and application.** In: *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*. Torremolinos: Formatex, v. 2, p. 880-890. 2010.

BAO, X.-L.; Lv, Y.; Yang, B.-C.; Ren, G.-G.; Guo, S.-T. **A study of the soluble complexed formed during calcium binding by soybean protein hydrolysates.** *J. Food Sci.*, 73, C117-C121, 2008.

BERGER, J.; Reist, M.; Mayer, J. M.; Felt, O.; Peppas, N. A.; Gurny, R.; **Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications.** *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 57, 19, 2004.

BLANCO, R.M., Terreros, P., Fernández-Pérez, M., Otero, C. and G. Díaz-González. **Functionalization of mesoporous silica for lipase immobilization. Characterization of the support and the catalysts.** *J. Molec. Catal. B: Enzym.* 30: 83–93 (2004).

BONATO, E.P., HELENO, G.J.B e HOSHINO, N.A. - **Leites Fermentados,** Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico – *Departamento de Engenharia Química e Alimentos* – Florianópolis, 2006.

BORTOLI, A. **Caracterização dos produtores de leite conveniados a escola federal de São Vicente do Sul-RS.** In: Reuniao Anual Da Sociedade Brasileira De Zootecnia, 2005. Goiânia: SBZ, CDROM, 2005.

BEZERRA, C.S. **Imobilização de  $\beta$ -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* em diferentes suportes e protocolos de ativação.** *Dissertação* (Mestrado em Engenharia Química), Departamento de Engenharia Química, UFC, Fortaleza, Brasil, 2012.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. MAPA. **Instrução Normativa nº 62**, DOU de 29 de dezembro de 2011.

BRÍGIDA, A. I. S. **Estudo da imobilização de lipase tipo B de *Candida antarctica* utilizando fibra de casca de coco verde como suporte.** *Dissertação* (Mestrado em Engenharia Química) – Centro de Tecnologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.

BRÍGIDA, A. I. S. **Imobilização de lipases utilizando fibra de casca de coco verde como suporte para aplicações industriais.** 2010. 193 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Escola de Química, Rio de Janeiro, 2010.

BYRNE, E. and J. Fitzpatrick. **Investigation of how agitation during precipitation, and subsequent processing affects the particle size distribution and separation of  $\alpha$ -lactalbumin enriched whey protein precipitates.** *Biochem. Eng. J.* 10: 17-25, 2002.

CALLERI, E.; Marrubini, G.; Massolini, G.; Lubda, D.; Fazio, S. S.; Furlanetto, S.; Wainer, I. W.; Manzo, L.; Caccialanza, G.; **Penicillin G acylase-based stationary phases: analytical applications.** *J. Pharm. Biomed. Anal.* Volume 35, Issue 2, 16 April, Pages 243–258, 2004.

CARDIAS, H. C. T.; Grininger, C. C.; Trevisan, H. C.; Guisán, J. M.; Giordano, R. L. C. **Influence of activation on the multipoint immobilization of penicillin G acylase on macroporous silica.** *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v.16, p.141-148. 1999.

CARDOSO, C.L; MORAES, M.C.; CASS, Q.B. **Imobilização de enzimas em suportes cromatográficos: uma ferramenta na busca por substâncias bioativas.** *Quim. Nova*, Vol. 32, No. 1, 175-187, 2009.

CARRARA, C., Mammarella, E. and A. Rubiolo. **Prediction of the fixed-bed reactor behaviour using dispersion and plug-flow models with different kinetics for immobilised enzyme.** *Chemical Engineering Journal*, 92 (2-3): 123-129, 2003.

CASTRO, H.F., LIMA, R. and I.C. ROBERTO. **Rice straw as a support for immobilization of microbial lipase.** *Biotechnol. Prog.* 17: 1061-1064, 2001.

CHINELATE, G. C. B.; SIRO, J.; ADRIANO, W. S.; MAMMARELLA, J. E.; GONÇALVES, L. R. B. **Imobilização de neutrase em bagaço de caju e coco**

**ativados por diferentes metodologias**, In: XVIII Congresso Brasileiro de Engenharia Química, Fóz do Iguaçu, Paraná, 2010.

CLAPE´S, P.; Pera, E.; Torres, J. L. **Peptide bond formation by the industrial protease Neutrase in organic media**. *Biotechnol. Lett.* 19, 1023–1026, 1997.

COELHO, M.A.Z et al. **Aproveitamento de Resíduos Agroindustriais: Produção de Enzimas a partir da Casca de Coco Verde**. B.CEPPA, Curitiba, v. 19, n. 1, p. 3342, jan./jun. 2001.

CORREIA, D.; ROSA, M. F.; NORÕES, E. R. V.; ARAÚJO, F. B. **Uso do pó da casca de coco na formulação de substratos para formação de mudas enxertadas de cajueiro anão precoce**. Revista Brasileira de Fruticultura, v. 25, n. 3, p. 557-558, 2003.

CUENCA, M. A. G.; RESENDE, J. M.; SAGGIN JUNIOR, O. J.; REIS, C. S. **Mercado brasileiro do coco: Situação atual e perspectivas**. In: ARAGÃO, W. M. (Org.). *Coco. Pós-colheita*. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 76p., 2002.

D´SOUZA, S.F. and S.S. GODBOLE. **Immobilization of invertase on rice husk using polyethylenimine**. *J. Biochem. Biophys. Meth.* 52: 59-62, 2002.

DALLA-VECCHIA, R.; Nascimento, M. G.; Soldi, V.; **Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros**. *Quim. Nova*, 27, 623, 2004.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K.L., FENNEMA, O.R. **Fennema´s Food Chemistry**. 4ed. New York: CRC Press. 1144p, 2007.

DELLAMATRICE, P.M. **Biodegradação e Toxicidade de Corantes Têxteis e Efluentes da Estação de Tratamento de Águas Residuárias de Americana, SP**. *Tese de Doutorado*. Escola Superior de Agronomia “Luiz de Queiroz” – ESALQ/USP. Piracicaba, 137 p., 2005.

DEY, M., Rao, C.P., Saarenketo, P.K. and K. Rissanen. **Synthesis, structural diversity, inter-conversion and reactivity of Cu(II) complexes of hydroxy-rich molecules**. *Inorg. Chem. Com.* 5 (6): 380-383, 2002.

DONNER, T. W.; WILBER, J. F.; OSTROWSKI, D. **D-Tagatose, a Novel Hexose: Acute Effects on Carbohydrate Tolerance in Subjects with and Without Type 2 Diabetes**. *Diabetes Obes Metab*, v. 1, p. 285–291, 1999.

DRYA´KOVA´, A.; Pihlanto A.; Marnila, P.; C´urda, L.; Korhonen, H.J.T. **Antioxidant properties of whey protein hydrolysates as measured by three methods**. *Eur Food Res Technol.* 230:865–874, 2010.

DWEVEDI, A. et al. **Lactose nano-probe optimized using response surface methodology**. *Biosensors and Bioelectronics* 25, 784–790, 2009.

EMBRAPA. **Produção Mundial de Queijos - 2007**. Embrapa Gado de Leite. Disponível em:

<<http://www.cnpqgl.embrapa.br/nova/informacoes/estatisticas/industria/tabela0423.php>>. Acesso em: 16 dez 2012

FARIAS, O. A. C. de. **Soro de leite em pó: Brasil caminha para auto-suficiência**. Disponível em: <http://www.milkpoint.com.br/mercado/espaco-aberto/soro-deleite-em-po-brasil-caminha-para-autossuficiencia-71038n.aspx>, de 13.04.2011, acesso em 24.09.2011.

FERREIRA, A. C. H.; Neiva, J. N. M.; Rodríguez, N. M.; Lobo, R. N. B. e Vasconcelos, V. R. , **Valor nutritivo das silagens de capim-elefante com diferentes níveis de subprodutos da indústria de suco de caju**, Revista brasileira de Zootecnia, v.33, n.6, p.1380-1385. 2004.

FINZER, J.R.D. MARTINS, J.R. **Cristalização de Lactose**. FAZU em Revista, Uberaba, n. 8, p. 83-88, 2011.

FONSECA, L.F.L.; SANTOS, M.V. **Qualidade do Leite e Controle de Mastite**. São Paulo: Lemos Editorial, 175p, 2000.

FOX, P.F. LACTOSE AND OLIGOSACCHARIDES | **Lactose**: Chemistry, Properties Encyclopedia of Dairy Sciences (Second Edition), Editor-in- Chief: John W. Fuquay, San Diego, Pages 173–181, 2011.

FREITAS, L.; Perez, V. H.; Santos, J. C.; de Castro, H. F.; **Enzymatic Synthesis of Glyceride Esters in Solvent-Free System**: Influence of the Molar Ratio, Lipase Source and Functional Activating Agent of the Support. J. Braz. Chem. Soc. 18, 1360, 2007.

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

GIRALDO-ZUNINGA, A.D. **Propriedades funcionais e nutricionais das proteínas do soro de leite**. Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes, v.57, n.325, p.35-46, 2002.

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

GOMES, F.M., Silva, G.S., Pinatti, D.G., Conte, R.A. and H.F. Castro. **Wood cellulignin as an alternative matrix for enzyme immobilization**. App. Biochem. Biotechnol. 121: 255-268, 2005.

GONDIM, D. R. **Produção de bioetanol utilizando células imobilizadas em bagaço de caju**. 2010. 39 f. Monografia (Graduação em Engenharia Química) – Centro de Tecnologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010.

GONZÁLEZ, F.H.D. **Composição bioquímica do leite e hormônios da lactação**. In: Uso do leite para monitorar a nutrição e o metabolismo de vacas leiteiras. Gráfica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2001.

GRANDI, J. G. **Leite fermentado, manteiga e queijo**. In: *Biotecnologia: Alimentos e Bebidas Produzidas por Fermentação*. São Paulo: Editora Edgar Blucher Ltda. V. 5, p.123-143,1983.

GROSOVÁ, Z.; ROSENBERG, M.; REBRŮS, M. **Perspectives and applications of immobilized  $\beta$ -galactosidase in food industry – a review**. *Czech J. Food Sci.* v. 26, n. 1, p. 1-14, 2008.

GUADIX A., F. Camacho and E. Guadix. **Production of whey protein hydrolysates with reduced allergenicity in a stable membrane reactor**. *J. Food Eng.* 72: 398-405. 2006.

GUIMARÃES, P.M.R; TEIXEIRA, J.A; DOMINGUES, L. **Fermentation of lactose to bioethanol by yeasts as part of integrated solutions for the valorization of cheese whey**. *Biotechnology Advances*, v.28, p. 375–384, 2010.

GUISÁN, J. M. **Immobilization of Enzymes and Cells**. 2. ed. Totowa: Humana Press. Cap. 1, p. 6-14, 2006.

HARTUNG, E., Martinec, M. and T. Jungbluth. **Biofilters** – the influence of different filter materials and different operating conditions on the reduction efficiency. *Water Sc. Technol.* 43: 253-260, 2001.

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

HIRANO, S.. **Chitin biotechnology application**. *Biotechnonology Annual Review*, v.2, p.237-258, 1996.

HOLSINGER, V. H. **Physical and chemical properties of lactose**. In: FOX, P. F. *Advanced dairy chemistry*. 2. ed. London: Chapman & Hall, v. 3, p. 1- 38. 1997.

IBGE. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. [http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa\\_201110.pdf](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa_201110.pdf). Acesso em 16 de novembro de 2012. (a)

IBGE. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. [http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia\\_visualiza.php?id\\_noticia=2241&id\\_pagina=1](http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=2241&id_pagina=1). Acesso em 16 de novembro de 2012. (b)

KIM, P. **Current studies on biological tagatose production using L-arabinose isomerase: a review and future rerspective**. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 65(3):243–249, 2004.

KIM, H. -J.; OH, D. -K. **Purification and Characterization of an L-Arabinose Isomerase from an Isolated Strain of *Geobacillus thermodenitrificans* producing D-Tagatose**. *J. Biotechnol.* v. 120, p. 162-173, 2005.

KOSIKOWSKI, F. V. **Whey utilization and whey products**. Journal Dairy Science., v.62, p.1149-1160, 1979.

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

KOUTINAS, A.A; Papapostolou, H; Dimitrellou, D; Kopsahelis, N; Katechaki, E; Bekatorou, A; Bosnea, L.A. **Whey valorisation: A complete and novel technology development for dairy industry starter culture production**. Bioresource Technology, v. 100, p.3734–3739, 2009.

KRAJEWSKA, B.; **Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review**. Enzyme Microb. Technol. 35, 126, 2004.

KUMAR, G., Bristow, J.F., Smith, P.J. and G.F. Payne. **Enzymatic gelation of the natural polymer chitosan**. Polymer 41: 2157–2168, 2000.

LAUS, R.; Laranjeira, M.C.M.; Martins, A.O.; Fávere, V.T. **Microesferas de quitosana reticuladas com tripolifosfato utilizadas para remoção da acidez, FERRO (III) e MANGANÊS (II) de águas contaminadas pela mineração de carvão**. Quim. Nova, v.29, n.1, p.34- 39, 2006.

LI, G. H.; Le, G. W.; Liu, H.; Shi, Y. H. **Mung-bean protein hydrolysates obtained with alcalase exhibit angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity**. Food Sci. Technol. Int, 11, 281–287. 2005.

LIMA, A.F. **Imobilização de uma  $\beta$ -galactosidase produzida por *Kluyveromyces lactis* NRRL Y-1564 cultivada em soro de leite**. Tese (Doutorado em Biotecnologia), RENORBIO, UFC, Fortaleza, Brasil, 2012.

LIRA, et al. **Microfiltração do soro de leite de búfala utilizando membranas cerâmicas como alternativa ao processo de pasteurização**. Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas, 2009.

LOPEZ-GALLEGO, F.; Montes, T.; Fuentes, M.; Alonso, N.; Grazu, V.; Betancor, L.; Guisan, J. M.; Fernandez-Lafuente, R.; **Improved stabilization of chemically aminated enzymes via multipoint covalent attachment on glyoxyl supports**. J. Biotechnol, 116, 1, 2005.

MADRID, A; Cenzano, I Vicente J.M. **Manual de indústrias dos alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, p.147-168, 1995.

MANZO, R.M; Mammarella, E.J. et al. **Ensayos preliminares para la producción y purificación parcial de una L-arabinosa isomerasa de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CRL63**. Congresso Brasileiro de Engenharia Química - Anais do COBEQ, p.233-241, 2011.

MARCHETTI, J. M.; Miguel, V. U.; Errazu, A. F. **Possible methods for biodiesel production.** *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 11, p. 1300-1311, 2007.

MATEO, C.; Palomo, J. M.; Fuentes, M.; Betancor, L.; Grazú, V.; López-Gallego, F.; Pessela, B. C. C.; Hidalgo, A.; Fernandez-Lorente, G.; Fernández-Lafuente, R.; Guisán, J. M. Glyoxyl agarose: **A fully inert and hydrophilic support for immobilization and high stabilization of proteins.** *Enzyme and Microbial Technology*, v.39, p.274–280. 2006.

MATIAS, M. F. O.; Oliveira, E. L.; Gertrudes, E. e Magalhães, M. M. A. (2005), **Use of fibres obtained from the cashew (*Anacardium occidentale, L.*) and guava (*Psidium guayava*) fruits for enrichment of food products.** *Brazilian Archives of Biology Technology*, 48, p.143-150.

MCCARTHY, A. J. and J. W. Maegli. **Protein fat replacer and method of manufacture thereof.** U.S. Patent 5350590, Beatreme Foods Inc. 1994.

MENDES, A. A.; de Castro, H. F.; Rodrigues, D. S.; Adriano, W. S.; Tardioli, P. W.; Mammarella, E. J.; Giordano, R. C.; Giordano, R. L. C.; **Multipoint covalent immobilization of lipase on chitosan hybrid hydrogels: influence of the polyelectrolyte complex type and chemical modification on the catalytic properties of the biocatalysts.** *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 2010.

MENDES, A.A.; Oliveira, P.C; Castro, H.F.; Giordano, R.L.C. **Aplicação de Quitosana Como Suporte Para a Imobilização de Enzimas De Interesse Industrial.** *Quim. Nova*, Vol. 34, No. 5, 831-840, 2011.

MENDOZA, M. R.; A. Olano, A.; Villamiel, M. **Chemical Indicators of Heat Treatment in Fortified and Special Milks.** *J. Agric. Food Chem*, v. 53, p. 2995–2999, 2005.

MOORE, M. C. **Drug Evaluation: Tagatose in the Treatment of Type 2 Diabetes and Obesity.** *Curr Opin Investig Drugs*, v. 7, p. 924–935, 2006.

MORRISSEY, P. A, **Lactose: chemical and physicochemical properties.** In: FOX, P. F. *Developments in dairy chemistry.* London: Elsevier Applied Science Publishers, v. 3. p. 1-34, 1985.

MUSSATTO, S. I.; Fernandes M.; Milagres A. M. F. **Enzimas, poderosa ferramenta na indústria.** *Ciência Hoje*, v. 41, n. 242, p. 33, 2007.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger princípios de bioquímica.** 3ª ed. São Paulo: Sarvier, 1202 p., 2002.

OGRODOWSKI, R. **Produção de Biomassa a partir do Soro de Queijo para Obtenção de Ribonucleotídeos.** *Tese de Doutorado* - Departamento de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

OLIVEIRA, C. A. F.; Fonseca, L. F. L.; Germano, P. M. L. **Aspectos relacionados à produção que influenciam a qualidade do leite.** *Higiene Alimentar*, v. 13, n. 62, p. 10-16, 1999.

OLIVEIRA, V. M. **Formulação de bebida láctea fermentada com diferentes concentrações de soro de queijo, enriquecida com ferro: caracterização físicoquímica, análises bacteriológicas e sensoriais.** *Dissertação de Mestrado*. Universidade Federal Fluminense. Niterói, Rio de Janeiro, 2006.

OU, K.; Liu, Y.; Zhang, L.; Yang, X., Huang, Z.; Nout, M.J.R.; Liang, J. **Effect of Neutrase, Alcalase, and Papain Hydrolysis of Whey Protein Concentrates on Iron Uptake by Caco-2 Cells.** *J. Agric. Food Chem.*, 2010, 58 (8), pp 4894–4900

ORDÓÑEZ, J. A. **Tecnologia de alimentos**, vol.II /Alimentos de origem animal. Porto Alegre: Artmed, p 279, 2007.

PACHECO, A. M. **Estudo da viabilidade da produção de etanol a partir de suco de caju (*Anacardium occidentale* L.) utilizando células imobilizadas em bagaço de caju.** 71 f. *Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Centro de Tecnologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009.*

PASSOS, P. R. A. **Destinação sustentável de cascas de coco (*Cocos nucifera*) verde: obtenção de telhas e chapas de partículas.** Rio de Janeiro. *Tese (Doutorado em Ciências em Planejamento Energético). Coordenação dos Programas de Pós-graduação de Engenharia – COPPE, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 186 p. 2005.*

PATRA, F.; Tomar, S. K.; Arora, S. **Technological and Functional Applications of Low-Calorie Sweeteners from Lactic Acid Bacteria.** *J. Food Sci*, v. 74, p. R16-R23, 2009.

PELEGRINE, D. H. G. & Carrasqueira, R. L. **Aproveitamento do soro do leite no enriquecimento nutricional de bebidas.** *Braz. J. Food Technol.*, VII BMCFB, 2008.

PELIZER, L. H.; Pontieri, M. H.; Moraes, I. de O. **Utilização de resíduos agro-industriais em processos biotecnológicos como perspectiva de redução do impacto ambiental.** *J. Technol.Manag. Innov.*, 2007.

PINHEIRO, A. D. T., Rocha, M. V. P., Macedo, G. R., Gonçalves, L. R. B. **Evaluation of Cashew Apple Juice for the Production of Fuel ethanol.** *Appl Biochem Biotechnol.*, v. 148, n. 1-3, p. 227-234, 2008.

PORTO, T.F., Silva, M.L.C.P., Silva, G.L.J.P. and H.F. Castro. **Atividade catalítica e estabilidade operacional da lipase microbiana imobilizada em fosfato de zircônio.** In: XIV Congresso Brasileiro de Engenharia Química - Anais do XIV COBEQ. Natal, Brasil. 2002.

RABIEY, L.; Britten, M. **Effect of whey protein enzymatic hydrolysis on the rheological properties of acid-induced gels** *Food Hydrocolloids*, Volume 23, Issue 8, Pages 2302–2308, December 2009.

- RAGHAVAN, S.; Kristinsson, H. G. **Antioxidative efficacy of alkali-treated tilapia protein hydrolysates: a comparative study of five enzymes.** J. Agric. Food Chem., 56, 1434–1441, 2008.
- RAMÍREZ-LÓPEZ, E., Corona-Hernández, J., Dendooven, L., Rangel, P. and F. Thalasso. **Characterization of five agricultural by-products as potential biofilter carriers.** Bioresource Technol. 88 (3): 259-263, 2003.
- RANGANATHAN, S. V.; Narasimhan, S. L.; Muthukumar, K. **An overview of enzymatic production of biodiesel.** Bioresource Technology, v. 99, p. 3975-3981, 2008.
- RECH, R; AYUB, M.A.Z. 2007. **Simplified feeding strategies for fed-batch cultivation of *Kluyveromyces marxianus* in cheese whey.** Process Biochemistry, v. 42, p.873–877, 2007.
- RICHARDS, N.S.P.S. **Soro Lácteo: Perspectivas Industriais e Proteção ao Meio Ambiente.** Food Ingredients, v. 3, n. 17, p. 20-27, 2002.
- RODRIGUES, D.S. **Estudo da Imobilização de Lipase B de *Candida antarctica* em Carvão Ativado e Quitosana.** Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de Ceará, Fortaleza, Brasil, 2005.
- RODRIGUES, S. D.; Mendes, A. A.; Adriano, S. W.; Gonçalves, B. R. L.; Giordano, C. L. R. **Multipoint covalent immobilization of microbial lipase on chitosan and agarose activated by different methods.** Journal of Molecular Catalysis b: Enzymatic, v. 51, p. 100-109, 2008.
- RODRIGUEZ PATINO, J.M, C. Carrera Sánchez, M.R. Rodriguez Niño and M.C Fernández. **Structural and dynamic properties of milk proteins spread at the air-water interface.** J. Colloid Interf. Sci.242:141-151. 2001.
- ROEPCKE, C. B. S. & Soccol, C. R. **Desenvolvimento de Bioprocesso para Produção de Biomassa de Levedura Rica em Zinco Orgânico.** Curitiba, 2007.
- RYU, S.; C. Kim, H. Kim, D. Baek and D. Oh. **Continuous D-Tagatose Production by Immobilized Thermostable L-Arabinose Isomerase in a Packed-Bed Bioreactor.** Biotechnol. Prog. 19: 1643-1647. 2003.
- SANJURJO P. **Bases metabólicas y nutricionales para el manejo de los errores innatos del metabolismo en fase de sospecha clínica.** Acta Nutricional. 18: 17-23. 1994.
- SANTOS, K.P.; Pinheiro, B.B.; Bezerra, C.S.; Souza, M.C.M; Gonçalves, L.R.B. **Imobilização de Lipases em Bagaço de Caju por Adsorção: Avaliação da Atividade Catalítica.** In: Simpósio Nacional de Bioprocessos, SINAFERM, 2011.

SENEVIRATHNE, M., Ahn, C-B., Je, J-Y. **Enzymatic Extracts from Edible Red Algae, *Porphyra tenera*, and Their Antioxidant, Anti-acetylcholinesterase, and Anti-inflammatory Activities.** Food Sci. Biotechnol. 19(6): 1551-1557, 2010.

SERPA, L. Priamo, W. L.; Reginatto, V. **Destino Ambientalmente Correto a Rejeitos de Queijaria e Análise de Viabilidade Econômica.** 2nd International Workshop | Advances in Cleaner Production, 2009.

SGARBIERI, V.C. **Proteínas em alimentos protéicos: propriedades, degradações e modificações.** São Paulo: Livraria Varela, 1996. 517 p.

SGARBIERI, V.C. **Revisão: Propriedades Estruturais e Físico-Químicas das Proteínas do Leite.** Braz. J. Food Technol. *Preprint Serie*, n.185, 2005.

SHELDON, R.A. Volume 9: **Industrial Applications of Asymmetric Synthesis. Comprehensive Chirality.** <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-08-095167-6.00917-4>, Pages 353–366, 2012.

SHIN, H. S.; Kim, S. B.; Kang, S. C.; Khan, M. A.; Kim, H. S.; Shin, H. J.; Chang, C. H. **Production of low antigenic cheese whey protein hydrolysates using mixed proteolytic enzymes.** J. Sci. Food Agric. 87, 2055–2060, 2007.

SISO M. I. G. **The biotechnological utilization of cheese whey: a review.** Bioresource. Technology, v. 57, p. 1-11, 1996.

SOARES, C.M.F., Castro, H.F., Santana, M.H.A. and G.M. Zanin. **Imobilização de lipase em sílica de porosidade controlada na presença de proteínas não enzimáticas.** In: XIII Congresso Brasileiro de Engenharia Química – Anais do XIII COBEQ, Águas de São Pedro, Brasil. 2000.

SMITHERS, G.W and A.D. Copeland. **International Whey Conference.** Trends Food Sci. Technol. 9: 119-123. 1997.

STEVENTON, A. J., A. M. Donald and L.F. Gladden. **Thermal aggregation of whey protein concentrates under fluid shear conditions.** Biochemistry of milk products Cambridge: Royal Society of Chemistry, Special Publication N° 150, pp. 133-142. (1994).

TÉO, C. R. P. A. **Intolerância à lactose: uma breve revisão para o cuidado nutricional / Lactose intolerance: a brief review for the nutritional care.** Arq. Ciências Saúde UNIPAR;6(3):135-140, set.-dez. 2002

TIBA, R. **Teoria da secagem na Industrialização de Leite em Pó Instantização – Secagem de Soro.** Primeiro Curso de Concentrados e Desidratados, p.5.23- 5.24, 1984.

TOLKACH, A. and U. Kulozik. **Fractionation of whey proteins and caseinomacropéptide by means of enzymatic crosslinking and membrane separation techniques.** J. Food Eng. 67: 13-20. 2005.

TOMITA, M., H. Wakabayashi, K. Yamauchi, S. Taraguchi and H. Hayasawa. **Bovine lactoferrin and lactoferricin derived from milk: production and applications.** *Biochem. Cell Biol.* 80: 109-112. 2002.

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

TOSTES, A. A. M. **Estudo da hidrólise enzimática do soro de queijo utilizando as lactases Prozym® e Lactozym®.** Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2006.

TRONCO, V.M. **Manual para inspeção da qualidade do leite.** 2a. Ed. - Santa Maria: UFSM, p. 168, 2003.

TSIGOS, I.; Martinou, A.; Kafetzopoulos, D.; Bouriotis, V. **Chitin deacetylases: new, versatile tools in Biotechnology.** *Trends Biotechnol.* 18, 305, 2000.

VASTENAVOND, C.M. Bertelsen, H. *et al.* **Alternative Sweeteners** – Fourth Edition. Chapter 13. Tagatose. 197:220, 2012.

VIEIRA, R. S. **Remoção e recuperação de Hg (II) utilizando quitosana natural ereticulada.** Dissertação (Mestrado). Engenharia Química, Unicamp, Campinas, 2004.

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

VIJAYA, G.V. **Effect of enzymatic hydrolysis of proteins on growth of *Bifidobacterium bifidus* in milk.** *Journal of the Science of Food and Agriculture* [0022-5142]. 2002 vol:82 iss:5 pg:493 -496

VILELA, S.C. **Cifra de transição em queijos.** Informativo Hala Biotec CHR Hansen. N.108, agosto/setembro, 2009.

VILLENEUVE, P.; Muderhwa, J. M.; Graille, J.; Haas, M. J.; **Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches.** *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 9, 113, 2000.

VIOQUE, J.; Sanchez-Vioque, R.; Clemente, A.; Pedroche, J.; Milla´N, F. **Partially hydrolyzed rapeseed protein isolates with improved functional properties.** *Journal. American Oil Chemistry. Soc.*, 77, 447–450, 2000.

WALSTRA, P.; Jenness, R. **Química y física lactológica.** Zaragoza: Editorial Acibia, 423 p. 1984.

WALSTRA, P. et al. **Ciência de la leche y tecnologia de los productos lácteos**. Zaragoza: Editorial Acribia, 729 p. 2001.

WONG, D. **Sweetener Determined Safe in Drugs, Mouthwashes, and Toothpastes**. Dent Today, v. 19, p. 34–35, 2000.

XU, Z., Qing Y., Li, S.; Xiaohai Feng, L., Xu, H., Ouyang P. **A novel l-arabinose isomerase from *Lactobacillus fermentum* CGMCC2921 for d-tagatose production: Gene cloning, purification and characterization**. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. 70, 1–7, 2011.

XU, Z., Qing Y., Li, S.; Xiaohai Feng, L., Xu, H., Ouyang P. **Production of D-tagatose, a Functional Sweetener, Utilizing Alginate Immobilized *Lactobacillus fermentum* CGMCC2921 Cells**. Appl Biochem Biotechnol. 166:961–973, 2012.

ZACARCHENCO, P. B.; Van Dender, A. G.; Spadoti, L. M.; Moreno, I. **Soro de leite: de problema ambiental a solução para tratamento de doenças**. Revista Leite e Derivados nº 106. Ano XVII ISSN 1807-9733. Julho 2008.

ZAFAR, S; OWAIS, M. **Ethanol production from crude whey by *Kluyveromyces marxianus***. Biochemistry Engineering, v. 27, p. 295-298, 2006.

ZINSLY, P.F.; Sgarbieri, V.C.; Pereira Dias, N.F.G.; Jacobucci, H.B., Pacheco, M.T.B; Baldini, V.L.S. **Produção piloto de concentrados de proteínas de leite bovino: composição e valor nutritivo**. Braz J Food Technol; 4:1-8. 2001.

ZHANG, H.; Jiang, B.; Pan, B. **Purification and Characterization of L-Arabinose Isomerase from *Lactobacillus plantarum* Producing D-Tagatose**. World J. Microbiol. Biotechnol, v.23, p. 641-646, 2007.

ZHANG, J.; Zhang, H.; Wang, L.; Guo, X.; Wang, X.; Yao, H. **Isolation and identification of antioxidative peptides from rice endosperm protein enzymatic hydrolysate by consecutive chromatography and MALDI-TOF/TOF MS/MS**. Food Chemistry. Volume 119, Issue 1. Pages 226–234. 2010.

---

*Capítulo 3*

*Artigos Derivados da Tese:*

*Neutrase*

---

## IMOBILIZAÇÃO DE NEUTRASE EM BIOCATALISADORES DE BAIXO CUSTO

G.C.B. CHINELATE<sup>1</sup>, F. B. BEZERRA<sup>1</sup>, J. E. MAMMARELLA<sup>3</sup>,  
W. S. ADRIANO<sup>2</sup> e L. R. B. GONÇALVES<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal do Ceará, <sup>2</sup>Universidade Federal de Campina Grande,  
<sup>3</sup>Universidad Nacional del Litoral, Intec  
E-mail para contato: lrg@ufc.br

### RESUMO

O objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de um protocolo de imobilização da enzima Neutrase ® utilizando fibra da casca de coco verde (FCV), bagaço de caju (CAB) e quitosana (QUIT). A FCV foi utilizada em quatro tratamentos diferenciados. Em contrapartida, o CAB foi preparado por tratamento ácido e alcalino para remover a hemicelulose e lignina, respectivamente. Para a QUIT, um biopolímero de fácil obtenção, fora utilizada em concentrações de 2,5% e 5,0% (p/v). Ambos os suportes foram ativados com glicidol, glutaraldeído, e epícloridrina. Neutrase (5,1 mg enzima.g de suporte<sup>-1</sup>) foi adicionada ao suporte ativado e manteve-se sob agitação a 25°C durante 3h. As atividades de Neutrase solúvel e imobilizadas foram avaliadas por análise espectrofotométrica a 700 nm de acordo com o ensaio de TCA-Lowry. Os derivados foram analisados quanto ao rendimento da imobilização (RI), atividade recuperada (AREc), tempo de meia-vida ( $t_{1/2}$ ) e fator de estabilização térmica (FE), comparado com a enzima solúvel. Para FCV lavada, o melhor RI foi de 79,45% e 63,40% de AREc, apresentando FE quatro vezes maior que a enzima neutrased solúvel, quando ativada com glutaraldeído. A CAB ativada com epícloridrina, apresentou melhor RI de 96,31% e 50,22% AREc. Os suportes de QUIT-2,5% ativados com glutaraldeído apresentaram melhores resultados de RI de 75,44%, 91,12% de AREc e FE cinco vezes maior que a enzima solúvel, sendo avaliadas também suas estabilidades operacionais com queda de até 41% após 10 ciclos.

**Palavras-chave:** Neutrased, imobilização, fibra de coco verde, bagaço de caju, quitosana.

### ABSTRACT

The aim of this work was to develop a Neutrased immobilization protocol using green coconut fiber (FCV), cashew apple bagasse (CAB) and chitosan (QUIT). The FCV was used in four different treatments. In contrast, the CAB was prepared by acid and alkaline treatment to remove the hemicellulose and lignin, respectively. The QUIT, a

biopolymer easily obtained, had been used 2.5% and 5,0% concentrations. Both supports were activated with glutaraldehyde glycidol and epichlorhydrin. Neutrased (5,1 mg enzima.g supporting-1) was added to activated support and kept under stirring at 25°C for 3h. Soluble and immobilized Neutrased activities were assessed by spectrophotometric analysis at 700 nm according to the TCA-Lowry assay. The derivatives were analyzed when the yield of immobilization (YI), activity recovered (AREC), half-life ( $t_{1/2}$ ) and thermal stabilization factor (SF) at 60°C, compared to soluble enzyme. For FCV washed best YI 79.45% and 63.40% of AREC presenting SF four times more than the soluble enzyme Neutrased when activated with glutaraldehyde. For CAB activated with epichlorhydrin, showed better RI 96.31% and 50.22% AREC. Supporters of QUIT-2, 5,0% activated glutaraldehyde showed better results of IR 75.44%, and 91.12% of AREC and SF five times greater than the soluble enzyme, and also evaluated their operational stabilities down to 41 % after 10 cycles.

**Keywords:** Neutrased, immobilization, coconut fiber, crushed cashews, chitosan.

## 1. INTRODUÇÃO

Apesar de existirem milhares de enzimas conhecidas e de seus múltiplos usos, somente algumas se converteram em catalisadores de processos industriais. Esta escassez de processos enzimáticos em escala industrial é o resultado da ausência de estudos integrais que solucionem os problemas existentes quando se propõe o projeto de uma reação enzimática. A modulação das propriedades das enzimas, através da imobilização em diferentes suportes, com diferentes métodos de ativação e em diferentes condições de imobilização, constitui uma alternativa tecnológica que contribui para solucionar ou atenuar os efeitos negativos das propriedades enzimáticas, possibilitando a sua utilização em um maior número de processos (CARDIAS, 1999).

O aumento dos esforços na pesquisa e no desenvolvimento de novos derivados vem permitindo a substituição de algumas rotas de síntese tradicionais por rotas enzimáticas com menor custos de produção e maior rentabilidade para as indústrias (SCHMID, 2002).

As enzimas por atuarem sob condições suaves e por serem de estruturas altamente complexas e, geralmente, frágeis sob condições adversas podem inativar-se, ou seja, perderem sua capacidade de catalisar reações (TARDIOLI, 2003). Daí a necessidade da imobilização, que possibilita a sua reutilização e aumenta a

resistência mecânica, o que permite a reação em diferentes condições de temperatura e pH.

A imobilização de enzimas consiste na sua confinação a uma região restrita, garantindo a retenção da atividade catalítica, e assegurando a possibilidade da sua utilização de forma repetida ou contínua (AIRES-BARROS E FERNANDES, 2003).

A Neutrase® é uma protease que hidrolisa proteínas do soro do leite, subprodutos altamente poluentes e descartados na indústria de laticínios, assim, destinando a um fim mais nobre para estes subprodutos. Segundo Richards (1997), a relação entre a quantidade de queijo produzido e soro do leite é de 1:10. De acordo com González Siso (1996), este derivado lácteo tem 0,7-0,9% de proteínas solúveis. Dos componentes presentes no soro, a lactose e proteínas solúveis são os mais importantes. As proteínas possuem alto valor nutricional, pois contêm todos os aminoácidos essenciais (FERREIRA, 1997), que são facilmente digeridos e com um alto poder nutricional. Essa grande quantidade de aminoácidos torna o soro do leite de interesse para indústria alimentícia, por poderem utilizar para aumentar o valor nutricional de proteínas de cereais de baixa qualidade (PONSANO, 1992).

A hidrólise do soro do leite por proteases possui vantagens a serem empregadas para fins alimentícios, no qual há um melhoramento nutricional e funcional, podendo sua mistura composta de peptídeos e aminoácidos livres, ser utilizada na preparação de fórmulas alimentícias infantis, produtos farmacêuticos e para nutrição esportiva (BOUDRANT E CHEFTEL, 1996). Outro benefício trazido pela hidrólise das proteínas do soro do leite por proteases é a redução das propriedades alergênicas, obtido pela hidrólise das proteínas  $\alpha$ -lactoalbumina e  $\beta$ -lactoglobulina (SCHMIDT E POLL, 1991).

Considerando o alto custo de alguns suportes comerciais disponíveis, estudos foram intensificados a fim de obtê-los mais baratos. Alguns trabalhos têm relatado o uso de resíduos agroindustriais como suportes de imobilização para  $\alpha$ -amilase (DEY, 2002), invertase (D'SOUZA E GODBOLE, 2002) e lipase (BRIGIDA, 2008). Estes estudos mostraram que os resíduos agroindustriais constituem uma fonte de matéria-prima adequada para uma matriz de imobilização.

Dentre os resíduos agroindustriais pode-se destacar a fibra da casca de coco verde, o bagaço de caju e a quitosana pelo impacto econômico, social e ambiental e quantidade gerados. No Brasil, um crescimento no mercado de água de

coco verde teve um impacto direto sobre o aumento da produção de casca de coco, um resíduo agroindustrial. Este resíduo leva até sete anos para se decompor, contribui para a propagação de doenças tropicais e é responsável pela redução de vida útil e extravasamento de aterros sanitários, devido ao descarte inadequado e ao volume ocupado, respectivamente. Em paralelo, a agroindústria do caju tem um papel de destaque na economia nos Estados do Nordeste Brasileiro, o bagaço de caju (CAB) - um subproduto da indústria de suco de caju - aparece como uma alternativa para a imobilização da enzima devido ao seu conteúdo lignocelulósico. CAB representa aproximadamente 20% do peso total de pedúnculo (SANTOS, 2007, ROCHA, 2009) e tem sido referida como uma matriz de imobilização por *Saccharomyces cerevisiae* (PACHECO, 2009). Já a quitosana é um biopolímero solúvel em meio ácido diluído, formando um polímero catiônico, com a protonação do grupo amino gerando o íon  $\text{NH}_3^+$ , que confere propriedades especiais diferenciadas em relação, por exemplo, às fibras vegetais (BERGER, 2004).

Por conseguinte, o objetivo do presente trabalho foi o de avaliar o potencial de CAB, fibra de coco verde e da quitosana como suporte para a imobilização de Neutrase®, que atrai um interesse considerável devido a uma grande variedade de aplicações possíveis, por exemplo, na produção de proteínas de alimentos funcionais, na melhoria da textura e propriedades sensoriais de produtos lácteos e na síntese de peptídeos em meio orgânico (ORTEGA, 2009; NEJAD, 2010).

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

A quitosana em pó com grau de desacetilação de 85,9% utilizada neste trabalho foi adquirida da POLYMAR IND LTDA, Fortaleza, Ceará. O bagaço do caju - cashew apple bagasse (CAB) - *Anacardium occidentale L.*, sem nenhum tratamento, foi gentilmente cedido por Jandaia Sucos do Brasil S/A (Ceará, Brasil). As fibras de coco verde foram obtidas de cascas de coco verde através de um processo desenvolvido pela Embrapa Agroindústria Tropical (CNPAT/EMBRAPA), Ceará, Brasil.

Os reagentes glicidol, epicloridrina, butirato de metila e caseína foram adquiridos pela Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO). Glutaraldeído foi adquirido da marca Vetec (São Paulo, Brasil). A Neutrase® foi gentilmente doada

pela Novozymes LatinAmerica Ltda. Todos os outros reagentes e solventes são de grau analítico.

## 2.1 Preparo dos suportes

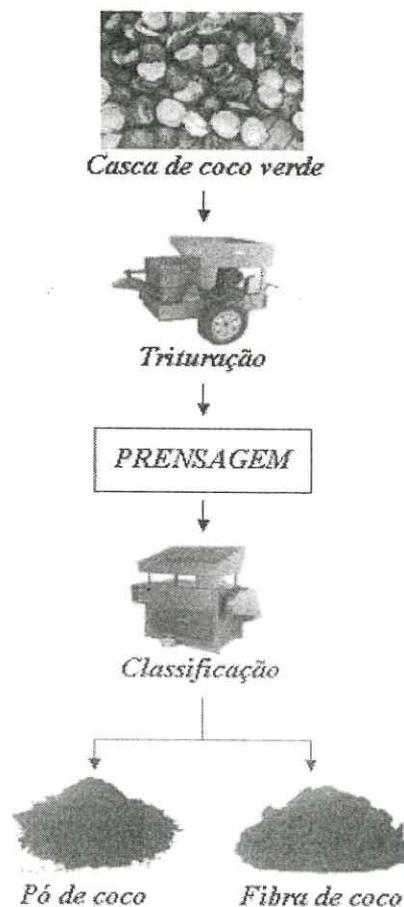
### ***Fibra de coco verde:***

O processo de obtenção da fibra de coco consistiu em submeter a casca de coco verde à trituração, seguida de prensagem e classificação (BRIGIDA, 2008), conforme Figura 7. Nesta pesquisa, utilizou-se de fibras de coco verde em quatro tratamentos: a fibra de coco bruta foi utilizada na forma que ela sai dos moinhos; a fibra de coco lavada passa pelo processo de lavagem em água destilada para fins de retirada dos resíduos de pó e outras impurezas; fibra de coco oxidada com peróxido de hidrogênio,  $H_2O_2$  (BRIGIDA, 2010); e a fibra de coco verde tratada termicamente, conjuntamente a um tratamento alcalino.

O tratamento de oxidação teve como objetivo, além da deslignificação da fibra de coco verde, formar grupos catiônicos à superfície da mesma, aumentando assim seu potencial de ligações covalentes durante as ativações. Para cada 2 gramas de fibra de coco, adicionou-se 40 mL da solução de NaOH e  $H_2O_2$ , sob agitação a temperatura aproximada de  $85^\circ C$ , durante 2 horas. Após este tratamento, submeteu-se a fibra oxidada a sucessivas lavagens com água destilada para retirar o excesso de soluções oxidantes e posterior secagem em estufa a  $60^\circ C$  (BRIGIDA, 2010).

A fibra de coco tratada termicamente em autoclave teve por objetivo a deslignificação da fibra em presença de solução alcalina de NaOH 4% (m/v), a  $121^\circ C$  por 30 minutos. Após este tratamento, neutralizou-se com  $H_3PO_4$  10% (m/v) até pH 5,5, secas em estufa a  $60^\circ C$  até massa constante. Após os tratamentos, as fibras foram lavadas cuidadosamente com água destilada e secas sob vácuo durante 2 horas.

Figura 6. Fluxograma de obtenção da fibra da casca de coco verde.



Fonte: Brígida (2010).

### ***Bagaço do pedúnculo do caju:***

Realizou-se o tratamento do bagaço de caju segundo o método utilizado por Dragone (2007) em bagaço de malte para produção de cervejas, com algumas adaptações. Na recepção da matéria-prima, realizou-se um procedimento de lavagem e prensagem com a finalidade de remover todo tipo de poeira e impurezas presentes na fibra do bagaço de caju. Todo material foi lavado por cinco vezes

consecutivas na proporção de 1:1 (litros de água destilada por cada quilo de fibra). Após a lavagem, o bagaço de caju foi seco em estufa durante um período de 24 horas.

Seguido da secagem, realizou-se uma trituração em moinho e posteriormente peneiramento para separar as frações adequadas para a imobilização: os tamanhos de partículas maiores foram enviados ao processo de trituração, ao contrário daqueles menores que foram descartados.

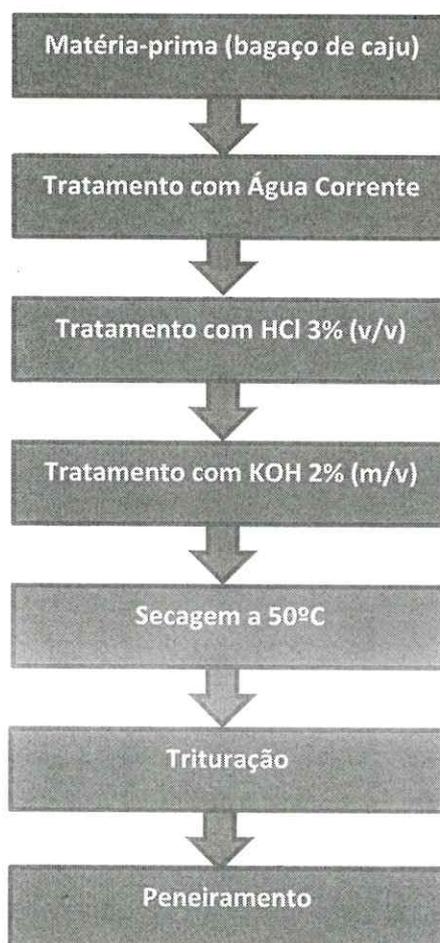
O fluxograma apresentado na Figura 8 descreve o procedimento utilizado para o tratamento do bagaço de caju.

O tratamento ácido teve como objetivo retirar a hemicelulose do bagaço de caju, outorgando ao suporte melhores características físicas para a imobilização, como por exemplo, o aumento da porosidade do material e com isto a área superficial do catalisador. Para cada 100 g de bagaço de caju, são necessários 1,5 L de solução de HCl 3% (v/v). Este procedimento de remoção da hemicelulose se realizou em um banho termostaticado mantendo a temperatura constante e igual a 60°C durante um período de 2,5 horas. Posteriormente, foi necessário a separação do bagaço de caju tratado da solução de HCl por filtração a vácuo. Foi necessária a correção do pH do bagaço de caju através da adição de uma solução tampão fosfato 200 mM com pH 8 na proporção de 1:2 (m/v) durante 15 minutos de agitação com baixa rotação. Logo da correção do pH do suporte, procedeu-se a secagem em estufa a 50°C durante 24h.

O tratamento alcalino teve como objetivo a remoção da lignina do suporte, com a finalidade de expressar suas características estruturais pois da remoção da lignina traduz-se em expor mais grupos hidrofílicos de carga positiva presentes na celulose, aumentando as probabilidades de absorção da Neutrase<sup>®</sup>, ou de grupos químicos, possuidores de cargas negativas. O procedimento de alcalinização foi realizado sob agitação a 120 rpm e 30°C por 24 h. O tratamento de deslignificação com base KOH 2% (m/v) foi na mesma proporção utilizado no tratamento ácido, considerando-se também os mesmos fatores para otimizar a mistura, ou seja, para cada 100g de bagaço utilizou 1,5 L de KOH 2% (m/v). Posteriormente, filtrou-se o bagaço tratado e neutralizou-se com solução tampão acetato de potássio 200 mM de pH 4,0. Depois o material foi lavado com água. Uma vez lavado, foi seco em estufa a 50°C, triturado em liquidificador e por último submetido a um ensaio de peneiramento, em peneiras

com diâmetro de poros entre 0,84 e 0,35 mm para obtenção do bagaço no tamanho desejado.

Figura 7. Tratamento do bagaço de caju.



Fonte: Adaptado de Dragone (2007).

#### **Quitosana 2,5% e 5,0% ( $m.v^{-1}$ ):**

Uma massa de 5g (2,5%) e 10 g (5,0%) de quitosana em pó foram dissolvidos em solução de ácido acético 5% (v/v) e deixada em homogeneização por 45 minutos.

O sistema solubilizado foi adicionado lentamente e sob agitação constante a 1,8L de solução de NaOH 0,1M.

Após 4h de agitação, o sistema foi colocado em repouso por 24h. Após este tempo as partículas foram lavadas com água destilada até sua neutralidade, sendo em seguida, seco por filtração a vácuo. Esse procedimento foi feito de acordo com o preconizado por Adriano (2008b).

## 2.2 Ativação dos Suportes

Antes da imobilização da enzima, os diferentes suportes investigados neste trabalho foram ativados com glicidol, glutaraldeído ou epícloridrina que produza grupos aldeídos moderadamente afastados do suporte para evitar impedimento estérico. A principal vantagem de se utilizar grupos aldeídos deve-se à reversibilidade da ligação amino-aldeído, que facilita a imobilização da enzima sem causar importantes distorções na estrutura protéica, enquanto reagem reversivelmente com grupos amino da enzima (ADRIANO, 2008b).

### Ativação com glutaraldeído:

Para a ativação com glutaraldeído, utilizou-se uma concentração de glutaraldeído 5,0% (v/v), adicionados a um grama de suporte em solução tampão fosfato de potássio 100 mM de pH 8,1 durante 3 horas. Uma vez ativado com glutaraldeído, prosseguiu-se o tratamento com posterior lavagem com excesso de água destilada e filtrado a vácuo.

### Ativação com glicidol:

Para a ativação foi utilizada  $\frac{1}{3}$  do volume de suporte de solução contendo NaOH 1,7 M e NaBH<sub>4</sub> 0,75 M em banho de gelo, adicionando 48% do volume final de glicidol lentamente. Deixando-se sob agitação constante de 90 rpm por 24 horas.

### Ativação com epicloridrina:

Em banho de gelo, 1 g de suporte diluída em 10 mL de NaOH 2M e 0,06 g de NaBH<sub>4</sub>, adicionando-se lentamente 1 mL de epicloridrina, deixando-se a temperatura ambiente durante 24 horas, sob agitação constante de 90 rpm.

### **2.3 Imobilização da Neutrase®**

Uma vez ativados, os suportes foram pesados e adicionados 10 mL de uma solução tampão e 0,1 mL (8,8 U/mL) de solução da enzima Neutrase® por 3h a 25°C. Para determinar as soluções tampões e pH para cada tipo de suporte, foram realizados testes prévios e determinadas as melhores condições a seguir: solução tampão fosfato de potássio 100 mM em pH 8,1 para CAB; solução tampão fosfato de sódio 200 mM em pH 10 para a fibra de coco verde; ou solução tampão fosfato de potássio 100 mM em pH 10 para quitosana, como suportes.

### **2.4 Determinação da Atividade da Neutrase®**

Para determinar a atividade da protease, o procedimento de obtenção de atividade da Neutrase® consistiu em adicionar 0,6 mL de solução enzimática a 3 mL de solução de caseína 15% (m/v) em tampão tetraborato 100 mM de pH 8,1, durante 5 minutos a 50°C; a reação era interrompida com a adição de 1,2 mL de TCA 17% (m/v). A proteína não hidrolisada precipitava na presença do TCA, podendo assim, quantificar a massa de proteína que tinha sido hidrolisada pela enzima, e com isto, a medição da atividade catalítica da Neutrase®.

O método escolhido para a quantificação da atividade enzimática da Neutrase® foi colorimétrico, utilizando-se 1 mL do sobrenadante centrifugado da reação de hidrólise, junto com 3 mL de carbonato de sódio 2% (m/v) e 1 mL de solução Follin-Cicalteu's (FC) com diluição de 1:2 (v/v) em água destilada, durante 30 minutos, e logo, realizando-se a leitura em espectrofotômetro a 700 nm, descrito por Ortega (2009), onde o fator de conversão é utilizado para que a unidade da atividade

enzimática que hidrolisa a caseína em pH 8.1 a 50°C fique em  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL}$  (U/mL). Sendo 1U correspondente a 1 $\mu\text{mol}$  de tirosina produzida por minuto em 1 mL de extrato.

Com o valor da absorbância medido pelo espectrofotômetro se obteve a concentração de tirosina [Tyr] (produto da hidrólise), pela equação (1):

$$[\text{Tyr}] = \frac{\text{abs} - 0,0332}{5,9885} \quad (1)$$

Substituindo o valor encontrado pela equação (1) na equação (2), tem-se a atividade enzimática (Ativ).

$$\text{Ativ} = \frac{[\text{Tyr}] \times V_r \times 5,52}{V_e \times T_r} \quad (2)$$

onde  $V_r$  é o volume do reator,  $V_e$  é o volume da enzima e  $T_r$  é o tempo de reação.

A fim de avaliar o processo de imobilização, quantificou-se a atividade hidrolítica da solução de enzima oferecida ao suporte ( $A_{T0}$  = atividade no tempo zero), do sobrenadante ao final do processo ( $A_{TI}$  = atividade teórica de imobilização) e do derivado obtido (AAP = atividade aparente do derivado). A partir destes dados foi possível calcular a atividade recuperada e o rendimento da imobilização: o rendimento de imobilização (RI) e atividade recuperada (ARec) foram calculados segundo as equações a seguir. RI é definida como o percentual de atividade enzimática que desapareceu no sobrenadante e imobilizadas no suporte (equação 3). ARec é a relação entre a atividade da enzima aparente, obtida pela medida direta da atividade do derivado e a diferença entre atividade no sobrenadante antes e depois da imobilização (equação 4), que pode ser considerada como atividade teórica derivada (RODRIGUES, 2008).

$$RI = \frac{A_{TI}}{A_{T0}} \times 100 \quad (3)$$

$$ARec (\%) = \frac{A_{AP}}{A_{TI}} \times 100 \quad (4)$$

## 2.5 Ensaio de Estabilidade Térmica

Amostras de Neutrase® livre ou imobilizadas foram incubadas em tampão fosfato de sódio de 100 mM em pH 8,1 a 60°C (ORTEGA, 2009). Periodicamente, alíquotas foram retiradas e as suas atividades residuais, analisadas. A constante de desativação térmica para cada derivado foram calculados de acordo com o modelo de ordem-1 proposto por Belver (2008). A atividade da enzima imobilizada através de método colorimétrico.

$$a = e^{-kd \times t} \quad (5)$$

Calculou-se o tempo de meia vida da enzima ( $t_{1/2}$ ) que é definido como o tempo necessário para que ocorra uma redução de 50% da atividade inicial, expresso em unidade de tempo, a partir da Equação 6, utilizando o parâmetro Kd estimado a partir da equação 5:

$$t_{1/2} = \frac{\ln(0,5 - \alpha)}{kd \times (1 - \alpha)} \quad (6)$$

Calculou-se também o Fator de Estabilização (FE) da enzima imobilizada, tendo os valores do tempo de meia vida da enzima solúvel e do derivado é possível calcular o fator de estabilização da enzima imobilizada. O fator de estabilidade é definido como a razão entre os tempos de meia vida do derivado e da enzima solúvel conforme equação 7:

$$FE = \frac{t_{1/2} \text{ derivado}}{t_{1/2} \text{ enzima solúvel}} \quad (7)$$

sendo, FE é o fator de estabilidade,  $t_{1/2}$  derivado é o tempo de meia-vida do derivado e  $t_{1/2}$  enzima solúvel é o tempo de meia-vida da enzima solúvel.

## 2.6 Estabilidade Operacional da Neutrase imobilizada

Para o suporte que apresentou melhores resultados foi realizado o estudo da estabilidade operacional submetendo o biocatalisador a 10 ciclos subsequentes à reação de hidrólise da caseína. A reação foi realizada em um reator descontínuo, mantido a 50°C, por 5 minutos, sob agitação constante.

## 2.7 Ensaios de Carga Máxima e Cinética Enzimática

Após a avaliação do melhor biocatalisador, diferentes cargas de enzima foram imobilizadas, sendo; 15, 40, 60, 80, 100, 130, 180 e 200 (mg Proteína/g de suporte). As soluções de enzimas foram preparadas em tampão fosfato de potássio 100 mM a pH 10.

Uma massa de quitosana (1g) foi adicionada a 10 mL da solução de enzima, no qual o sistema que ficou sob uma agitação de 30 rpm durante 3 horas a uma temperatura de 25°C. Ao fim desse período o biocatalisador foi lavado com água destilada.

Quanto à cinética, as concentrações de caseína usadas para as medidas de atividades foram entre 2,5 e 40 g/L. A equação 8 utilizada para a obtenção das velocidades máximas e das constantes cinéticas foram as do modelo cinético de Michaelis-Menten.

$$v(S) = \frac{V_{max} \times S}{K_m + S} \quad (8)$$

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A seguir serão apresentados os resultados da preparação dos derivados obtidos no processo de imobilização da enzima Neutrase<sup>®</sup> em suportes desenvolvidos a partir da fibra de coco verde (FCV), bagaço de caju (CAB) e quitosana (QUIT), tais como rendimento de imobilização, atividade recuperada, atividade teórica de imobilização e atividade aparente do derivado, assim como, fatores de estabilização térmica e operacional dos melhores derivados obtidos.

#### 3.1.1 Atividade hidrolítica da enzima solúvel

A atividade hidrolítica da enzima solúvel, extrato comercial Neutrase<sup>®</sup> adquirida da Novozymes Latin America Ltda., apresentando 51 mg de proteína/mL extrato, corresponde a 88U/mL.

#### 3.1.2 Parâmetros de Imobilização da Neutrase imobilizada em Fibra da Casca de Coco Verde

Os suportes de Fibra da Casca de Coco Verde (FCV) natural, lavada, oxidada e tratada termicamente foram ativadas com glicidol, epicloridrina e glutaraldeído, de acordo com o descrito no item 2.2. Após a ativação procedeu-se a imobilização da Neutrase em tampão fosfato de sódio 200 mM e pH 10, a temperatura ambiente, por um período de 24 horas.

A Tabela 4 apresenta os resultados relativos aos parâmetros de imobilização para os derivados obtidos para Neutrase solúvel e imobilizada em FCV após ativação com glicidol. Observa-se que a Fibra de Coco Verde é adequada para a imobilização da enzima Neutrase por apresentar resultados suscetíveis de aplicações práticas dos derivados estudados.

Tabela 4 - Imobilização da Neutrase® em suporte de fibra de coco verde (FCV) ativadas por glicidol com carga oferecida de 5,1 mg de enzima.g<sup>-1</sup>gel (8,8 U.g<sup>-1</sup> gel) por 3h, sendo (RI) rendimento de imobilização, (ARec) atividade recuperada, (A<sub>TI</sub>) atividade teórica de imobilização e (AAP) atividade aparente.<sup>1,2</sup>

Biocatalisadores	RI (%)	ARec (%)	A <sub>TI</sub> (U.g <sup>-1</sup> suporte)	AAP (U.g <sup>-1</sup> suporte )
FCV Natural	54,14 <sup>a</sup> ± 1,81	51,52 <sup>a</sup>	4,76	2,45
FCV Lavada	68,78 <sup>b</sup> ± 0,85	79,97 <sup>b</sup>	6,05	4,83
FCV tratada com H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	59,21 <sup>c</sup> ± 1,25	51,76 <sup>a</sup>	5,21	2,69
FCV tratada termicamente	63,81 <sup>c</sup> ± 2,60	49,73 <sup>c</sup>	5,61	2,78

<sup>1</sup> Média ± desvio padrão de determinações em triplicata.

<sup>2</sup> Numa mesma coluna, letras iguais não diferem significativamente entre si (p>0,05).

Os melhores resultados para estes suportes ativados com glicidol foi a FCV lavada apresentando em média 68,78% de rendimento de imobilização e 79,97% de atividade recuperada. Isso implica em menor volume de catalisador a ser utilizado em reator, pois apresenta uma maior carga de enzima imobilizada.

Resultados da Tabela 5 demonstram que após a ativação com epicloridrina, os biocatalisadores apresentaram melhora significativa quando comparados com as imobilizações em FCV ativados com glicidol. Os suportes ativados com epicloridrina exibem maior grau de ativação do que aqueles com glicidol.

Tabela 5. Imobilização da Neutrase® em suporte de fibra de coco verde (FCV) ativadas por epícloridrina com carga oferecida de 5,1 mg de enzima.g<sup>-1</sup>gel (8,8 U.g<sup>-1</sup> gel) por 3h, sendo (RI) rendimento de imobilização, (AREc) atividade recuperada, (A<sub>TI</sub>) atividade teórica de imobilização e (AAP) atividade aparente.<sup>1,2</sup>

Biocatalisadores	RI (%)	AREc (%)	A <sub>TI</sub> (U.g <sup>-1</sup> suporte)	AAP (U.g <sup>-1</sup> suporte )
FCV Natural	93,26 <sup>a</sup> ± 0,47	62,38 <sup>a,c</sup>	8,20	5,11
FCV Lavada	84,33 <sup>b</sup> ± 2,15	55,62 <sup>b</sup>	7,42	4,13
FCV tratada com H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	86,09 <sup>a,b</sup> ± 2,33	67,80 <sup>c</sup>	7,57	5,13
FCV tratada termicamente	65,58 <sup>c</sup> ± 2,29	58,90 <sup>a,b</sup>	5,77	3,39

<sup>1</sup> Média ± desvio padrão de determinações em triplicata.

<sup>2</sup> Numa mesma coluna, letras iguais não diferem significativamente entre si (p>0,05).

Comparando os dados obtidos na imobilização de Neutrase em FCV ativadas com glutaraldeído, mostrou-se que o suporte que ofereceu melhor rendimento imobilizado foram ativadas com epícloridrina, mas quem apresentou melhor atividade recuperada no meio sobrenadante foram ativados com glutaraldeído (Tabela 6). Grupos aldeído produzidos após a ativação com glutaraldeído são muito reativos e podem imobilizar a enzima após a ligação com o grupo amina (ADRIANO, 2008).

Uma melhoria significativa do rendimento de imobilização não foi observada quando a fibra de coco verde foi submetida a tratamentos químicos. Após o tratamento térmico, por exemplo, a lignina foi removida e, conseqüentemente, sítios ativos da enzima podem ter sido eliminados, que levam a diminuir os valores de RI e AREc, em comparação com a fibra de coco verde natural. A mesma hipótese pode ser usada para explicar os resultados obtidos com a fibra de coco verde tratada com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, pois a oxidação com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> também é removida lignina da fibra (BRIGIDA, 2010).

Tabela 6. Imobilização da Neutrase® em suporte de fibra de coco verde (FCV) ativadas por glutaraldeído com carga oferecida de 5,1 mg de enzima.g<sup>-1</sup>gel (8,8 U.g<sup>-1</sup> gel) por 3h, sendo (RI) rendimento de imobilização, (ARec) atividade recuperada, (A<sub>T1</sub>) atividade teórica de imobilização e (AAP) atividade aparente.<sup>1,2</sup>

Biocatalisadores	RI (%)	ARec (%)	A <sub>T1</sub> (U.g <sup>-1</sup> suporte)	AAP (U.g <sup>-1</sup> suporte )
FCV Natural	64,53 <sup>a</sup> ± 1,12	77,21 <sup>a</sup>	5,67	4,37
FCV Lavada	79,45 <sup>b</sup> ± 0,68	63,40 <sup>b</sup>	6,99	4,43
FCV tratada com H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	75,44 <sup>b</sup> ± 2,64	61,22 <sup>b</sup>	6,64	4,06
FCV tratada termicamente	64,97 <sup>a</sup> ± 1,91	73,77 <sup>a</sup>	5,72	4,21

<sup>1</sup> Média ± desvio padrão de determinações em triplicata.

<sup>2</sup> Numa mesma coluna, letras iguais não diferem significativamente entre si (p>0,05).

#### 4.1.3 Parâmetros de Imobilização da Neutrase imobilizada em Bagaço de Caju (CAB)

Os suportes de bagaço de caju (CAB) foram preparados e ativados com glicidol, epícloridrina e glutaraldeído, de acordo com o descrito no item 3.1 e 3.2. Após a ativação procedeu-se a imobilização da Neutrase em tampão fosfato de potássio 100 mM e pH 8,1, a temperatura ambiente, por um período de 24 horas.

A Tabela 7 apresenta os resultados relativos aos parâmetros de imobilização para os derivados obtidos para Neutrase solúvel e imobilizada em CAB após ativações. O rendimento de imobilização (RI) apresentou-se maior quando o bagaço de caju fora ativado com glicidol, epícloridrina e glutaraldeído, quando comparados com FCV com mesmas ativações.

Pode-se observar que os resultados para o bagaço de caju (CAB) ativados através de epícloridrina e glutaraldeído, apresentaram melhores resultados de RI quando comparado com glicidol. Por outro lado, apresentam atividade recuperada inferior, que pode ser devido a efeitos estéricos ou falta de congruência geométrica

entre suporte-enzima, induzido pelas ativações diferentes. O tratamento básico do suporte por meio do uso de hidróxido de sódio, com o objetivo de remover a lignina do CAB, promove ainda o aumento da possibilidade da enzima penetrar no suporte, e assim realizar sua imobilização, como verificado por Pacheco (2009).

Tabela 7. Efeito do suporte e método de ativação na imobilização da Neutrase® em suporte de bagaço de caju (CAB) ativadas por glicidol, epícloridrina e glutaraldeído, com carga oferecida de 5,1 mg de enzima.g<sup>-1</sup>gel (8,8 U.g<sup>-1</sup> gel) por 3h, sendo (RI) rendimento de imobilização, (ARec) atividade recuperada, (A<sub>Ti</sub>) atividade teórica de imobilização e (AAP) atividade aparente.<sup>1,2</sup>

Biocatalisadores	RI (%)	ARec (%)	A <sub>Ti</sub> (U.g <sup>-1</sup> suporte)	AAP (U.g <sup>-1</sup> suporte)
CAB – glicidol	76,57 <sup>a</sup> ± 0,21	53,39 <sup>a</sup>	6,74	3,59
CAB – epícloridrina	96,31 <sup>b</sup> ± 0,99	50,22 <sup>b</sup>	8,48	4,26
CAB – glutaraldeído	93,42 <sup>b</sup> ± 1,27	47,67 <sup>c</sup>	8,22	3,92

<sup>1</sup> Média ± desvio padrão de determinações em triplicata.

<sup>2</sup> Numa mesma coluna, letras iguais não diferem significativamente entre si (p>0,05).

#### 4.1.4 Parâmetros de Imobilização da Neutrase imobilizada em Quitosana

Os suportes de quitosana a 2,5% e quitosana 5,0% (QUIT) foram preparados e ativados com glicidol, epícloridrina e glutaraldeído, de acordo com o descrito no item 3.2. Após a ativação procedeu-se a imobilização da Neutrase em tampão fosfato de potássio 100 mM e pH 10, a temperatura ambiente, por um período de 24 horas.

Na utilização de quitosana 2,5% e quitosana 5,0% como suporte para a imobilização da neutrase ativadas com glicidol, foram encontrados baixos rendimentos de imobilização (22,18% e 19,38%, respectivamente), e as mais altas atividades recuperadas (100% e 87,42%, respectivamente).

Já as ativações com glutaraldeído apresentaram melhores RI e ARec (Tabela 8). Este melhor resultado se deve à combinação da ativação de quitosana

com glutaraldeído, tornando o suporte com maior número de grupos aldeídos os quais se ligam aos grupos amino da Neutrase, pois na quitosana há um maior número desses grupos. Tal resultado de imobilização é devido à presença de grupos amino no suporte quitosana, os quais reagem com os grupos de aldeídos do ativador, que por sua vez, também reage com os grupos amino da enzima.

Ortega (2009) ao imobilizar Neutrase em suporte de alginato ativado com glutaraldeído, obteve rendimento de imobilização experimental de 58,63%.

Tabela 8. Efeito do suporte e método de ativação na imobilização da Neutrase® em suporte de quitosana (QUIT) ativadas por glicidol, epicloridrina e glutaraldeído, com carga oferecida de 5,1 mg de enzima.g<sup>-1</sup>gel (8,8 U.g<sup>-1</sup> gel) por 3h, sendo (RI) rendimento de imobilização, (ARec) atividade recuperada(A<sub>TI</sub>) atividade teórica de imobilização e (AAP) atividade aparente.<sup>1,2</sup>

Biocatalisadores	RI (%)	ARec (%)	A <sub>TI</sub> (U.g <sup>-1</sup> suporte)	AAP (U.g <sup>-1</sup> suporte )
QUIT 2,5% – glicidol	22,18 <sup>a</sup> ± 0,58	100 <sup>a</sup>	1,95	1,95
QUIT 5,0% - glicidol	19,38 <sup>b</sup> ± 0,58	87,42 <sup>b</sup>	1,70	1,48
QUIT 2,5% – epicloridrina	51,47 <sup>c</sup> ± 0,71	11,32 <sup>c</sup>	4,52	0,51
QUIT 5,0% - epicloridrina	31,45 <sup>d</sup> ± 0,58	39,10 <sup>d</sup>	2,76	1,07
QUIT 2,5% – glutaraldeído	75,44 <sup>e</sup> ± 0,93	91,12 <sup>e</sup>	6,63	6,04
QUIT 5,0% - glutaraldeído	67,21 <sup>f</sup> ± 0,58	81,10 <sup>f</sup>	5,91	4,79

<sup>1</sup> Média ± desvio padrão de determinações em triplicata.

<sup>2</sup> Numa mesma coluna/seção, letras iguais não diferem significativamente entre si (p>0,05).

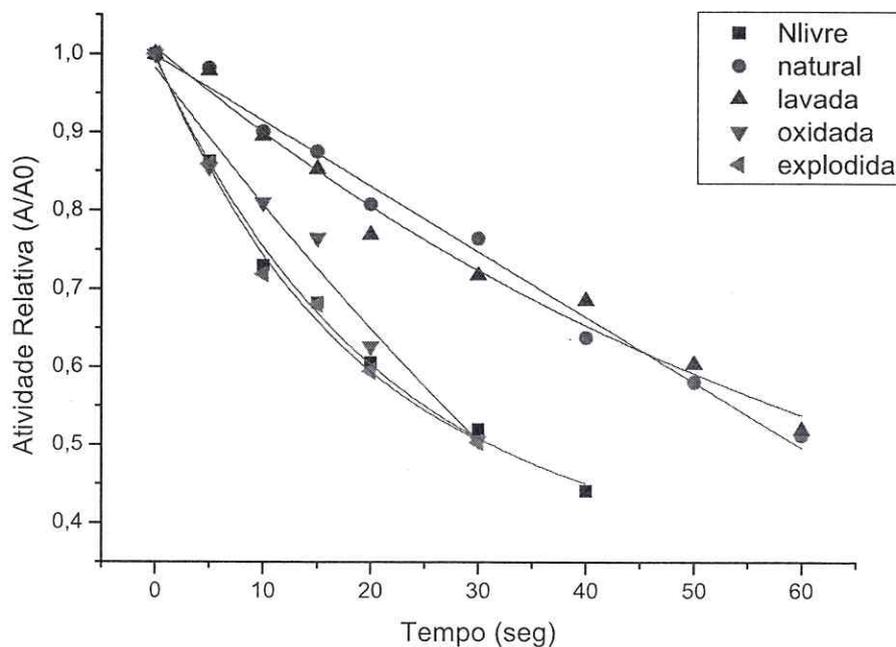
#### 4.1.5 Estudo da Estabilidade Térmica dos Derivados Obtidos

Os biocatalisadores desenvolvidos foram avaliados quanto à sua estabilidade térmica em temperatura de 60°C, conforme procedimento descrito por Ortega *et al.* (2009). Foram determinados o  $t_{1/2}$  (tempo de meia vida), fator de estabilidade térmica (FE), bem como a constante de desnaturação térmica (kd), aplicando o modelo de Sadana-Henley (1987), indicados por meio das tabelas e figuras 9 a 13, a seguir.

Tabela 9. Parâmetros de estabilidade térmica da imobilização da Neutrase® em suporte de fibra de coco verde (FCV) ativadas por glicidol: ( $t_{1/2}$ ) tempo de meia-vida e (FE) fator de estabilização a 60°C. Valores estimados para as constantes de desnaturação térmica (kd), em função da temperatura, aplicando modelo de Sadana-Henley (1987).

Biocatalisadores	Sadana e Henley (1987)			$t_{1/2}$ (min)	FE
	kd	$\alpha$	$R^2$		
Neutrase solúvel	0,0234	0,1350	0,9837	0,5	1
FCV Natural	0,0121	$5,5621e^{-11}$	0,9771	60	120
FCV Lavada	0,0128	$1,8502e^{-10}$	0,9553	60	120
FCV tratada com H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0,0230	$7,0012e^{-12}$	0,9585	30	60
FCV tratada termicamente	0,0251	0,0097	0,9888	30	60

Figura 8. Estabilidade Térmica a 60°C dos derivados obtidos a partir da imobilização de Neutrase em suporte de Fibra da Casca de Coco Verde ativadas com Glicidol.



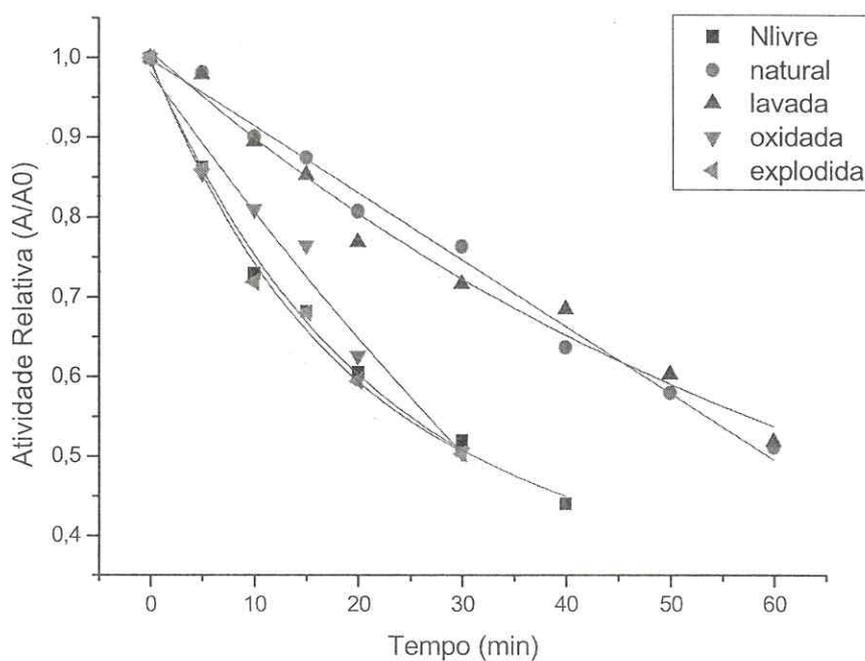
A ativação via glicidol levou a um aumento até 120 vezes maior na estabilização térmica em FCV natural e lavada quando comparadas à enzima solúvel (Tabela 9). Os melhores resultados para estes suportes ativados com glicidol foram a FCV lavada apresentando em média 68,78% de rendimento de imobilização e 79,97% de atividade recuperada.

O alto percentual de carga imobilizada e consequente aumento na atividade recuperada destes derivados ativados com glicidol foram estáveis tanto quanto sua enzima solúvel. Como epicloridrina é mais reativa que glicidol, mais grupos aldeídos foram adicionados no suporte além de grupos oxirano, o que permitiria a formação de mais ligações enzima-suporte, explicando assim o aumento no fator de estabilidade (Tabela 10), porém houve melhora significativa na estabilização de FCV oxidada quando comparada com o mesmo biocatalisador ativado com glicidol.

Tabela 10. Parâmetros de estabilidade térmica da imobilização da Neutrase® em suporte de fibra de coco verde (FCV) ativadas por epicloridrina: ( $t_{1/2}$ ) tempo de meia-vida e (FE) fator de estabilização a 60°C. Valores estimados para as constantes de desnaturação térmica (kd), em função da temperatura, aplicando modelo de Sadana-Henley (1987).

Biocatalisadores	Sadana e Henley (1987)			$t_{1/2}$ (min)	FE
	kd	$\alpha$	$R^2$		
Neutrase solúvel	0,0234	0,1350	0,9837	0,5	1
FCV Natural	0,0263	0,0834	0,9995	30	60
FCV Lavada	0,0214	$1,5792e^{-13}$	0,9670	30	60
FCV tratada com $H_2O_2$	0,0116	$8,8325e^{-10}$	0,9717	60	120
FCV tratada termicamente	0,0327	0,1936	0,9630	30	60

Figura 9. Estabilidade Térmica a 60°C dos derivados obtidos a partir da imobilização de Neutrase em suporte de Fibra da Casca de Coco Verde ativados com Epicloridrina.



Melhores resultados de estabilidade térmica foram obtidos quando a neutrase foi imobilizada em fibra de coco verde natural ativada com glutaraldeído, com fator de estabilidade 300 vezes maior que a enzima solúvel (Tabela 11). Tempo de meia-vida dos derivados preparados usando suportes de coco verde ativado com glutaraldeído foram superiores (Figura 11) aos valores alcançados quando os outros agentes de ativação (glicidol e epícloridrina) foram utilizados.

Tabela 11. Parâmetros de estabilidade térmica da imobilização da Neutrase® em suporte de fibra de coco verde (FCV) ativadas por glutaraldeído: ( $t_{1/2}$ ) tempo de meia-vida e (FE) fator de estabilização a 60°C. Valores estimados para as constantes de desnaturação térmica (kd), em função da temperatura, aplicando modelo de Sadana-Henley (1987).

Biocatalisadores	Sadana e Henley (1987)			$t_{1/2}$ (min)	FE
	kd	$\alpha$	$R^2$		
Neutrase solúvel	0,0234	0,1350	0,9837	0,5	1
FCV Natural	0,0065	0,1860	0,9879	150	300
FCV Lavada	0,0068	0,1188	0,9902	120	240
FCV tratada com $H_2O_2$	0,0065	$3,8708e^{-08}$	0,9910	120	240
FCV tratada termicamente	0,0061	$1,665e^{-08}$	0,9904	120	240

Estes resultados podem ser explicados pela alta reatividade dos grupos aldeídos do glutaraldeído, que o torna versátil, sendo utilizado em condições muito diferentes, conforme afirma Rodrigues (2008).

Quando analisadas as estabilizações térmicas (Tabela 12), os biocatalisadores de CAB apresentaram-se baixas. Apenas a ativação via glicidol levou a um aumento significativo na estabilização quando comparadas à enzima solúvel (Figura 11).

Figura 10. Estabilidade Térmica a 60°C dos derivados obtidos a partir da imobilização de Neutrase em suporte de Fibra da Casca de Coco Verde ativadas com Glutaraldeído.

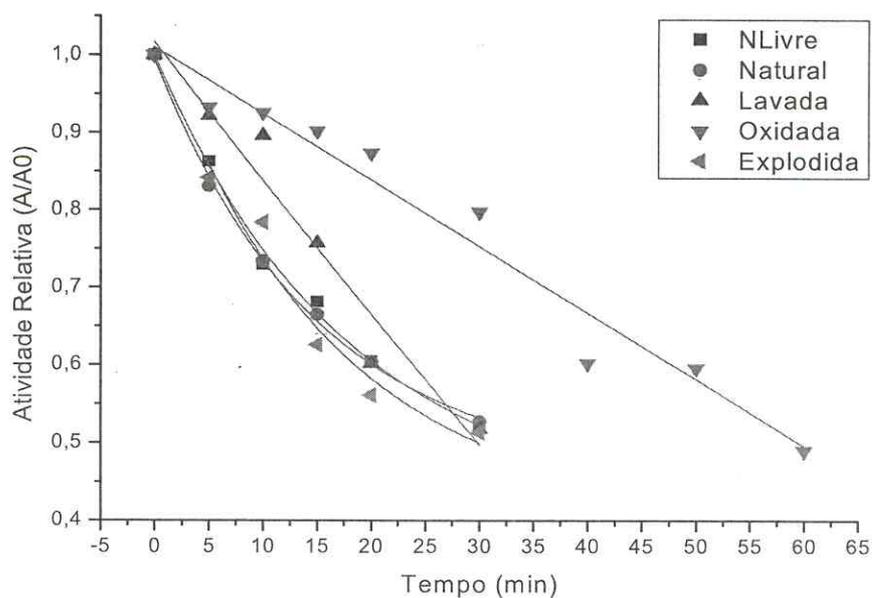
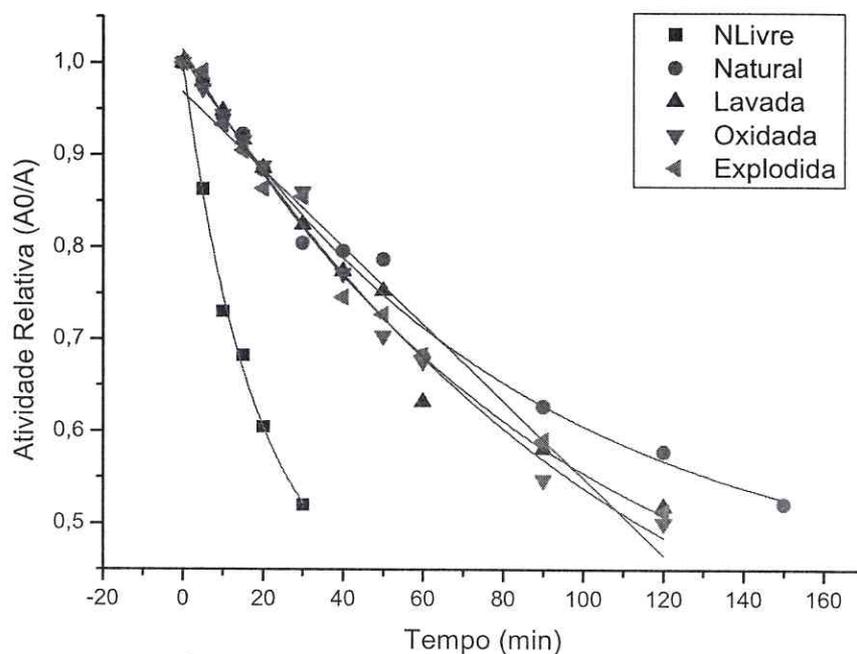


Tabela 12. Parâmetros de estabilidade térmica da imobilização da Neutrase® em suporte de bagaço de caju (CAB) ativadas por glicidol, epícloridrina e glutaraldeído,; ( $t_{1/2}$ ) tempo de meia-vida e (FE) fator de estabilização a 60°C. Valores estimados para as constantes de desnaturação térmica ( $k_d$ ), em função da temperatura, aplicando modelo de Sadana-Henley (1987).

Biocatalisadores	Sadana e Henley (1987)			$t_{1/2}$ (min)	FE
	$k_d$	$\alpha$	$R^2$		
Neutrase solúvel	0,0234	0,1350	0,9837	0,5	1
CAB – glicidol	0,0872	$6,9354e^{-5}$	0,9898	60	120
CAB – epícloridrina	0,0920	$1,3943e^{-6}$	0,9529	30	60
CAB – glutaraldeído	0,0397	-0,9652	0,9843	30	60

Figura 11. Estabilidade Térmica a 60°C dos derivados obtidos a partir da imobilização de Neutrase em suporte de bagaço de caju (CAB).



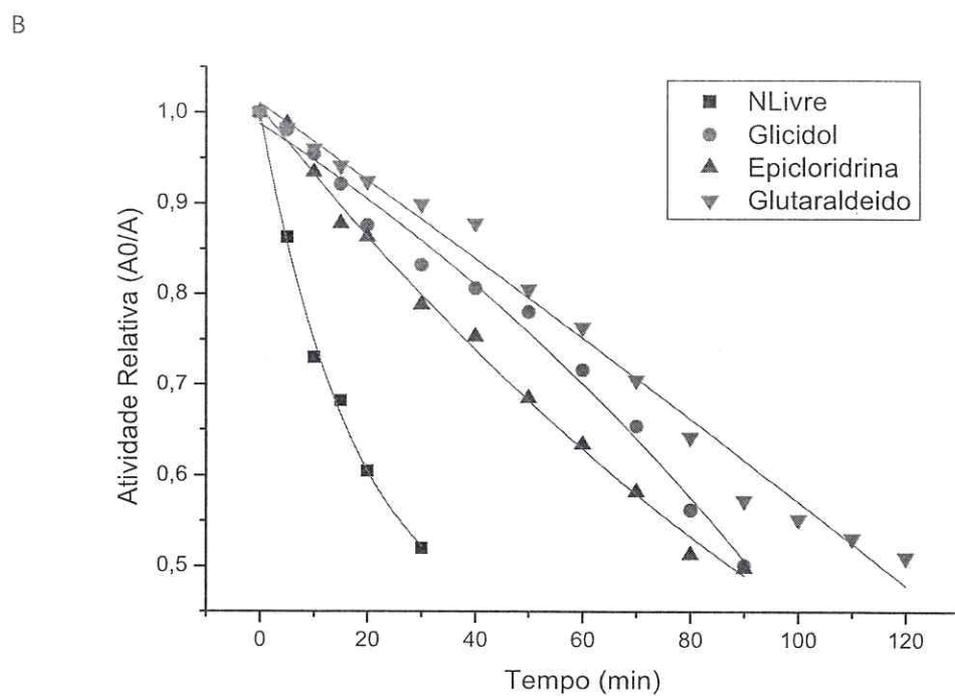
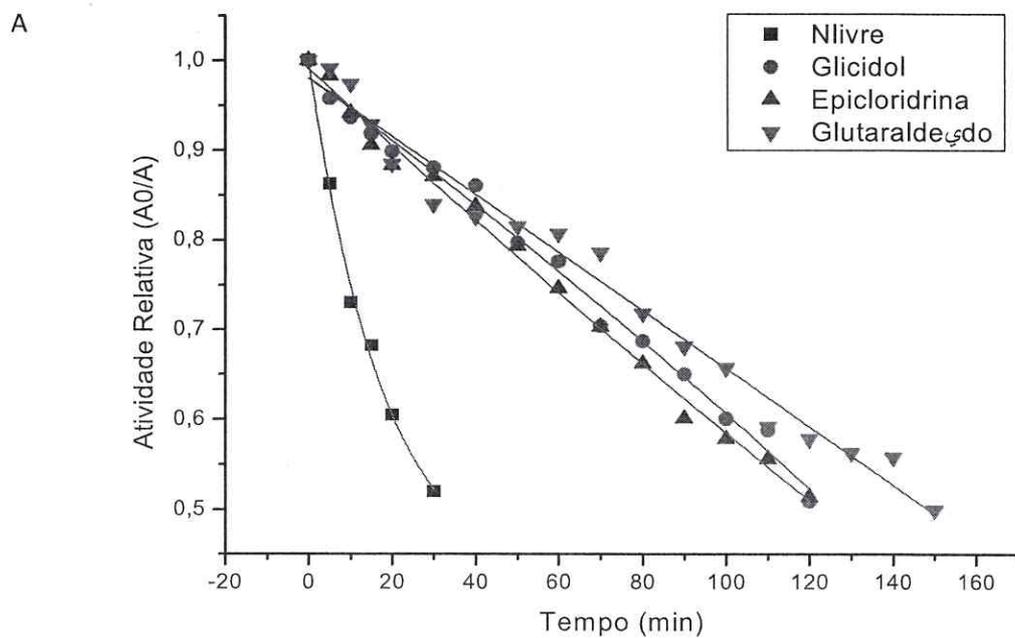
Melhores resultados de estabilidades térmicas foram obtidos quando a neutrase foi imobilizada em quitosana, quando comparadas com os suportes anteriormente discutidos (fibra de coco verde – com seus respectivos tratamentos – e bagaço de caju) (Tabela 13). O biocatalisador constituído de quitosana a 2,5% apresentou melhor estabilização (Figura 13A) do que o mesmo suporte de maior concentração, 5,0% (Figura 13B). Com as ativações com glutaraldeído obtiveram-se maior fator de estabilização térmica.

Tabela 13. Parâmetros de estabilidade térmica da imobilização da Neutrase® em suporte de quitosana (QUIT) ativadas por glicidol, epicloridrina e glutaraldeído: ( $t_{1/2}$ ) tempo de meia-vida e (FE) fator de estabilização a 60°C. Valores estimados para as constantes de desnaturação térmica (kd), em função da temperatura, aplicando modelo de Sadana-Henley (1987).

Biocatalisadores	Sadana e Henley (1987)			$t_{1/2}$ (min)	FE
	kd	$\alpha$	$R^2$		
Neutrase solúvel	0,0234	0,1350	0,9837	0,5	1
QUIT 2,5% – glicidol	0,0051	0,4123	0,9906	120	240
QUIT 5,0% - glicidol	0,0070	0,4119	0,9855	90	180
QUIT 2,5% – epicloridrina	0,0053	2,8231	0,9927	120	240
QUIT 5,0% - epicloridrina	0,0084	1,4084	0,9931	90	180
QUIT 2,5% – glutaraldeído	0,0042	0,9794	0,9771	150	300
QUIT 5,0% - glutaraldeído	0,0060	0,7289	0,9826	120	240

Através deste protocolo de imobilização a congruência geométrica entre enzima ativada ao suporte foi mais eficiente em biocatalisadores oriundos da quitosana-glutaraldeído, que promoveu uma melhor insolubilização da enzima. Este é um fato importante, considerando que os biocatalisadores que serão usados em aplicações industriais, precisam de enzimas mais estáveis (Figura 13), tornando-os mais adequados para a imobilização da enzima em estudo.

Figura 12. Estabilidade Térmica a 60°C dos derivados obtidos a partir da imobilização de Neutrase em suporte de quitosana 2,5% (A) e quitosana 5,0% (B).

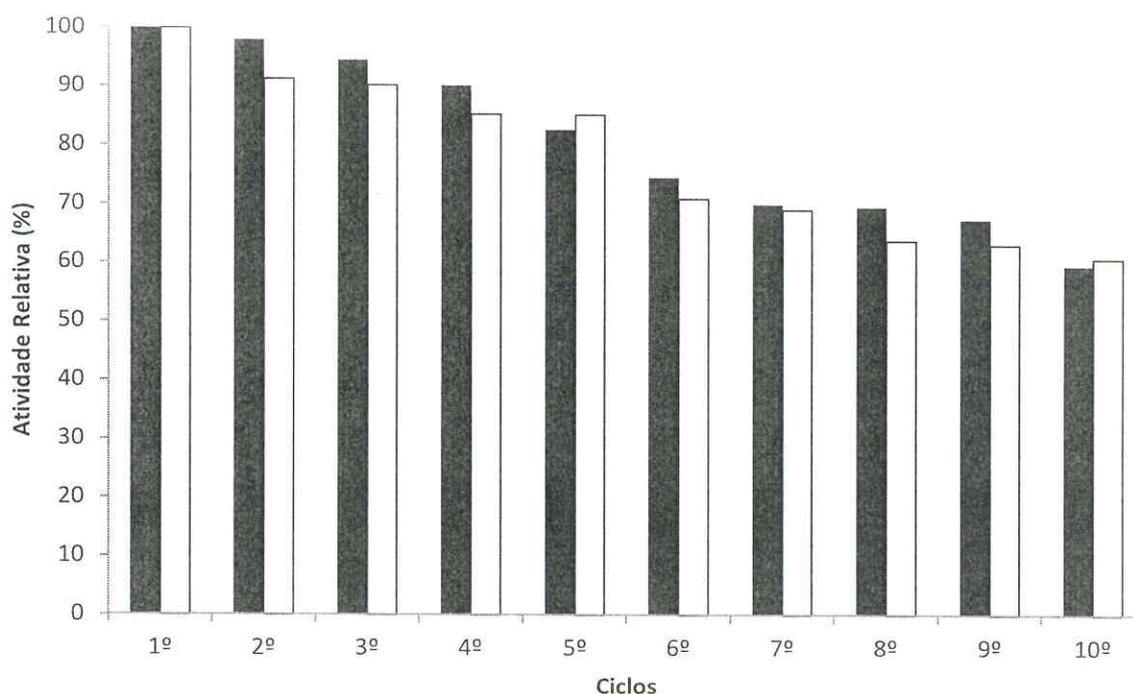


#### 4.1.6 Estabilidade Operacional da Neutrased em Biocatalisadores de Quitosana

De acordo com os resultados obtidos, realizaram-se ensaios de Estabilidade Operacional objetivando a aplicação dos biocatalisadores de quitosana em reatores de sistema descontínuo. Testes de estabilidade operacional foram realizados em 10 ciclos, por meio de bateladas seguidas com os suportes de quitosana 2,5% e quitosana 5,0% ativadas com glutaraldeído, pois este suporte apresentou melhores resultados de rendimento de imobilização, atividade recuperada e tempo de meia-vida/fator de estabilização.

Durante a execução dos ciclos de batelada, houve perda de massa significativa entre o 1º e o último ciclo na proporção de 16% no suporte de quitosana 2,5% e de 15% no suporte de quitosana 5,0%. Como consequência desta perda de massa do biocatalisador, houve queda na atividade relativa durante os ciclos, na proporção de 41% e 59%, respectivamente, conforme demonstra a Figura 14.

Figura 13. Estabilidade Operacional da Neutrased imobilizada a 25°C, em quitosana 2,5% (■) e quitosana 5,0% (□), ativadas com glutaraldeído.



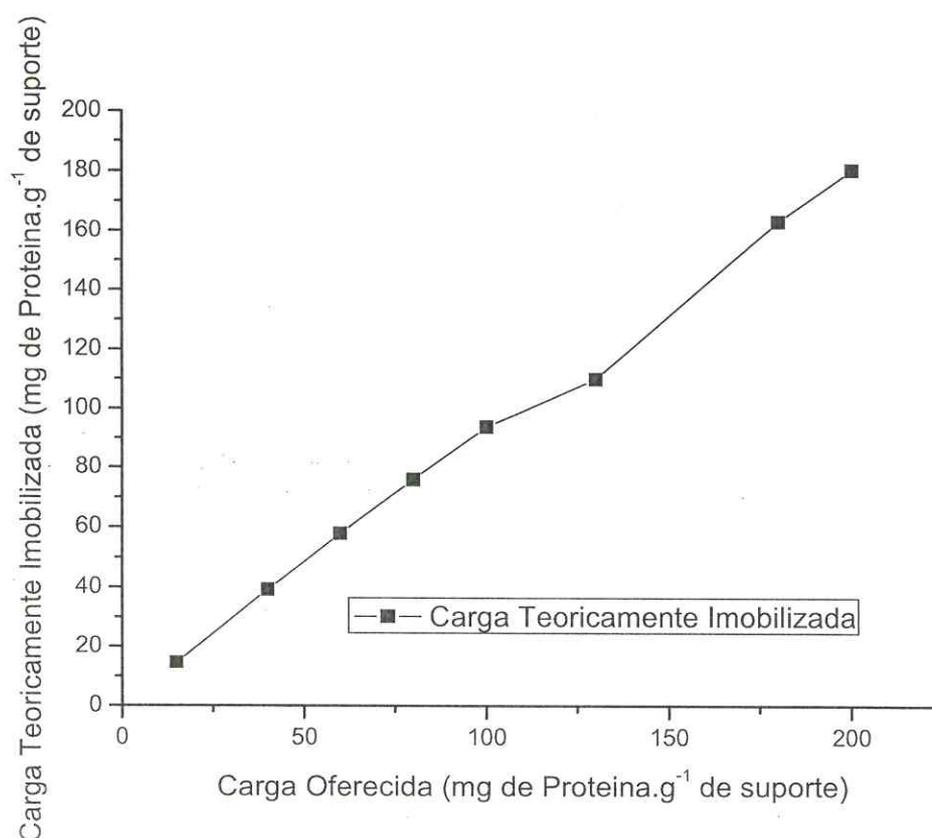
Segundo GUISÁN (2006), muitas vezes quando uma enzima é imobilizada sua estabilidade operacional é melhorada. O conceito de estabilização tem sido, assim, uma importante força motriz para a imobilização de enzimas. Em muitos casos, a estabilização operacional observada é geralmente o resultado de um excesso de carga de enzima.

#### **4.1.6 Parâmetros de Carga máxima e Efetividade**

Para determinação da carga máxima teórica de imobilização, foram realizados ensaios com concentrações de enzimas oferecidas inicialmente de 15, 40, 60, 80, 100, 130, 180 e 200 mg de proteína/g de gel. Na Figura 10 são apresentados os resultados, onde observa-se que, mesmo oferecendo 200 mg de Proteína/g de gel, o suporte não chegou a seu ponto de saturação, tendo uma imobilização de 180,48 mg de proteína/g de gel. A explicação esta possivelmente relacionada à natureza porosa do suporte (RODRIGUES, 2008) e aos grupos reativos, que com sua grande área superficial, possibilita que grande quantidade de enzima seja imobilizada. Sendo, portanto a quitosana um suporte bastante eficaz para imobilização e viável pelo baixo custo e grande disponibilidade no país.

Observa-se que apenas com uma carga oferecida de 130 mg de proteína/g de gel, que se teve um rendimento de imobilização menor que 90%. Sendo que, de modo geral, o rendimento de imobilização diminui com o aumento de carga oferecida, mesmo que pequena. Esse comportamento era esperado, pois com pouca quantidade de proteína a tendência é que a reação enzima-suporte ocorra na superfície do suporte. Para cargas mais altas, a superfície do suporte, primeira região onde ocorre reação, já está saturada de proteína (enzima), sendo necessário que esta difunda até o interior dos poros da quitosana. Isso atrasa a reação de imobilização, até que todos os grupos reativos, tanto na superfície como dentro dos poros do suporte, já estejam ligados à proteína, chegando à saturação do suporte (MENDONÇA, 2006).

Figura 14. Neutrase® teoricamente imobilizada (mg de proteína.g<sup>-1</sup> de gel) em função da massa de proteína oferecida.

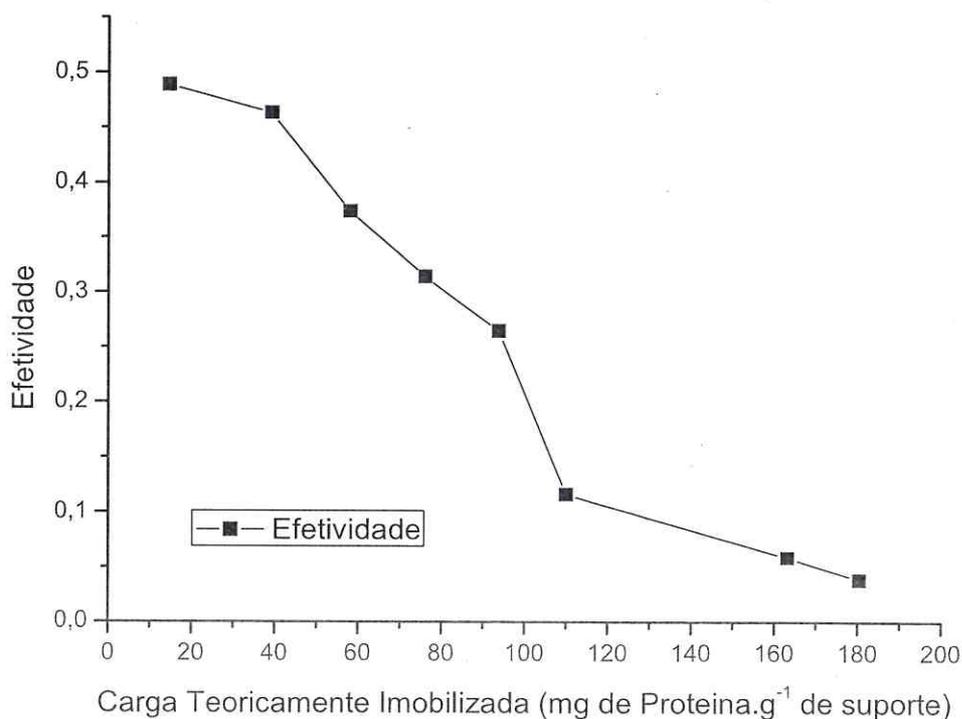


A caseína que é o substrato para a Neutrase® tem uma alta massa molar, o que se pode esperar uma menor velocidade de difusão, com maiores efeitos estéricos na medida em que se aumenta a carga de enzima oferecida. Portanto, se espera que as velocidades aparentes sejam menores que as que seriam obtidas em enzimas livres por menor que seja a carga de enzima oferecida.

Como esperado há uma queda da atividade do derivado em relação à enzima livre. Uma possibilidade é estar ocorrendo severos efeitos estéricos e/ou conformacionais, devido ao tamanho do substrato, ou mudanças na estrutura da enzima (BRYJAK E TROCHIMCZUK, 2006). Isso ocorre porque com baixas cargas enzimáticas as restrições difusionais são menores, pois com o baixo volume de enzima a reação ocorre na parte mais externa do suporte, então não há a necessidade de que ocorra difusão da caseína para o interior da quitosana para reagir com a enzima que se encontra no seu interior (MENDONÇA, 2006). Porém, mesmo diante desta queda de efetividade (Figura 16), é compensador pelo fato de

haver muita enzima imobilizada, destacando ainda que reatores industriais operam com derivados com alta carga (BEZERRA, 2012).

Figura 15. Efetividade da Neutrase® imobilizada em função da carga enzimática oferecida.



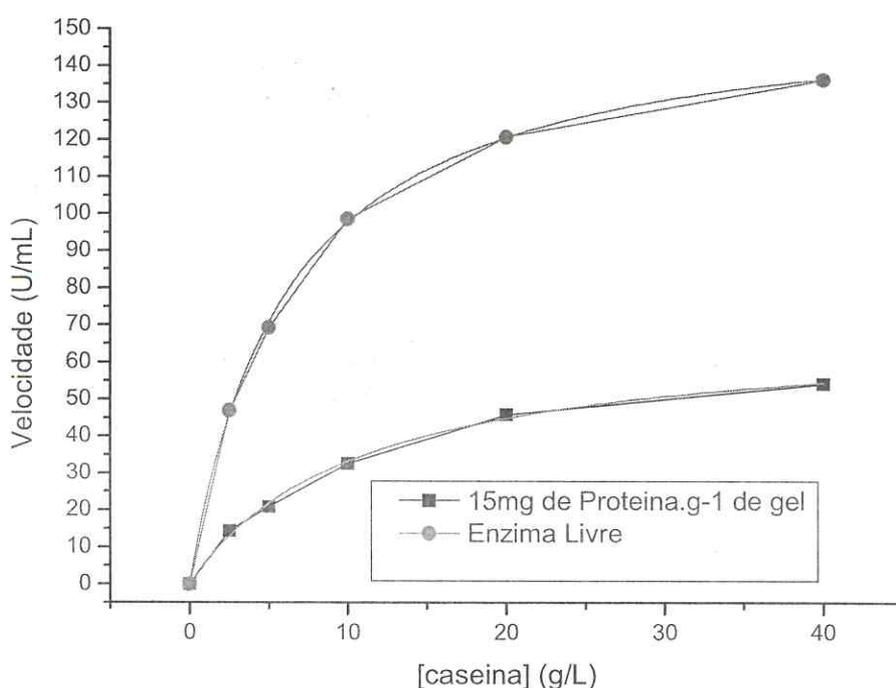
#### 4.1.7 Estudo Cinético

Com o modelo de Michaelis-Menten (Equação 8) determinou-se a velocidades máximas das reações e a constante de Michaelis-Menten. Para isso foram usados diferentes concentrações de substratos, usando-se enzima livre e imobilizada com carga oferecida de 15 mg/g de gel.

Segundo Carvalho (2011), a concentração de substrato é um fator de grande influência sobre a velocidade de hidrólise, não só por razões cinéticas, mas também porque altas concentrações de sólidos agem sobre a eficácia de mistura e sobre as resistências ao transporte de massa.

A Figura 17 mostra o ajuste que foi dado com a Equação 3 para as diferentes concentrações de substratos, tanto para enzima livre como também para a carga oferecida de 15 mg de Proteína/g de gel. Nota-se que a equação de Michaelis-Menten se ajustou bem aos pontos experimentais. Com  $R^2$  de 0,999 e 0,997 para enzima livre e enzima imobilizada respectivamente (Tabela 14).

Figura 16. Ajuste do modelo de Michaelis-Menten para a reação de hidrólise da caseína



Ortega *et al.* (2009) realizaram o estudo cinéticos com Neutrase® imobilizada em alginato e também observaram que a protease imobilizada teve uma constante de Michaelis maior que a enzima solúvel. Segundo o autor o aumento no  $K_m$  na enzima imobilizada indica que essa tem uma afinidade aparentemente mais baixa que a enzima livre, o que pode ser causado pelo impedimento estérico do sítio ativo pelo suporte ou uma perda de flexibilidade de enzima necessária para a ligação do substrato.

Tabela 14. Parâmetros cinéticos da enzima livre e imobilizada.

Neutrase	$K_m$ (g.L <sup>-1</sup> )	Vmax (U.mL <sup>-1</sup> )	$\eta$	R <sup>2</sup>
Enzima Livre	6,08	157,25	---	0,999
Enzima Imobilizada	10,87	69,24	0,48	0,997

#### 4. CONCLUSÃO

Foram estudadas metodologias para imobilização de Neutrase em diferentes suportes orgânicos e de baixo custo disponíveis na região Nordeste do Brasil, tais como fibra de casca de coco verde, bagaço de caju e quitosana ativadas por diferentes protocolos. Estudaram-se os melhores derivados obtidos, sendo os resultados obtidos bem satisfatórios, como os citados a seguir.

Além da utilização de rejeitos da indústria pesqueira e agroindústria (fibra de casca de coco verde e bagaço de caju), através das matérias-primas utilizadas biocatalisadores alternativos como a quitosana, reduzindo o impacto ambiental, possibilita uma produção de peptídeos com inúmeras aplicações no melhoramento de produtos na indústria de alimentos.

Observou-se que fibra da casca de coco verde, bem como o bagaço de caju podem ser utilizados como suporte de imobilização para a Neutrase, porém melhores resultados de rendimento de imobilização foram alcançados quando a enzima foi imobilizada em quitosana. Sobre agentes de ativação, o glutaraldeído parece ser o mais adequado, desde que os valores mais elevados de meias-vidas foram alcançados.

Tais resultados também permitiram verificar que há uma influência positiva na ativação de copolímeros e de diferentes métodos de ativação no protocolo de imobilização de Neutrase® em quitosana. Os géis de quitosana 2,5% ativados com glutaraldeído apresentaram melhores resultados quanto ao rendimento da imobilização, no qual não se chegou ao ponto de saturação deste suporte mesmo

tendo oferecido uma carga de 200 mg de proteína. Este é um resultado esperado pela natureza de alta porosidade do suporte, que por isso oferece uma elevada área superficial por unidade de área para imobilização da enzima.

Como o substrato tem uma grande massa molar esperava-se, devido a isso, grandes efeitos estérico que causariam à caseína grande restrições difusionais, impossibilitando que esta possa reagir com a enzima imobilizada no interior do suporte. Isso foi confirmado pelos dados experimentais que mostram uma queda brusca da efetividade com o aumento da carga de enzima imobilizada. Os estudos cinéticos vêm a confirmar os efeitos estéricos nos quais a restrição difusional ao substrato está diretamente relacionada à velocidade da reação, já que nem todas as moléculas de enzimas estarão disponíveis para reagir com o substrato.

## AGRADECIMENTOS

Os autores gostariam de agradecer as Agências Brasileiras de Financiamento CAPES e CNPq. Também estamos gratos à EMBRAPA pelas fibras de coco verde.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADRIANO, W. S., Mendonça, D. B., Rodrigues, D. S., Mammarella, E. J., Giordano, R. C. L., **Improving the Properties of Chitosan as Support for the Covalent Multipoint Immobilization of Chymotrypsin**. *Biomacromolecules*, 9, 2170-2179. 2008 (a)

AIRES-BARROS, M. R.; Fernandes, P. **Engenharia enzimática**, p.121-130. Lidel : Lisboa-Pt (2003).

BELVER C., Tamayo J.J., Molinero L., Ladero M., Pessela B.C.C., Guisán J.M., Garcia-Ochoa F., 2008, **Immobilization-stabilization of Candida Antarctica Lipase B in Agarose-glyoxyl and Agarose-octyl: Deactivation Kinetics**. *Chemical Engineering Transactions*, 14, 329-336.

BOUDRANT, J.; CHEFTEL, C. **Continuos proteolysis with a stabilized protease. II. Continuos experiments**. *Biotechnology and Bioengineering*, v.18, p. 1735-1749, 1996.

BRIGIDA A. I. S., Pinheiro A. D. T., Ferreira A. L. O. and Gonçalves L. R. B., 2008, **Immobilization of *Candida antarctica* lipase B by adsorption to green coconut fiber**. Applied Biochemistry and Biotechnology, 146, p. 173-187.

BRIGIDA A.I.S., Calado V.M.A., GONÇALVES L.R.B. and Coelho M.A.Z., 2010, **Effect of chemical treatments on properties of green coconut fiber**. Carbohydrate Polymers, 79, 832-838.

CARDIAS, H. C. T.; GRININGER, C. C.; TREVISAN, H. C.; GUISÁN, J. M.; GIORDANO, R. L. C. **Influence of activation on the multipoint immobilization of penicillin G acylase on macroporous silica**. Brazilian Journal of Chemical Engineering, v.16, p.141-148, 1999.

D'SOUZA, S. F. and Godbole, S. S., 2002, **Immobilization of invertase on rice husk using polyethylenimine**. Journal of Biochemical and Biophysical Methods, 52, 59-62.

DEY G.; Nagpal V. and Banerjee R., **Immobilization of alpha-amylase produced by *Bacillus circulans* GRS 313**. Applied Biochemistry and Biotechnology, 102-103, 303-313, 2002.

DRAGONE, G.; MUSSATTO, S. I.; **SILVA, J. B. A. Utilização de mostos concentrados na produção de cervejas pelo processo contínuo: novas tendências para o aumento da produtividade**. Ciênc. Tecnol. Aliment., vol.27, suppl.1, pp. 37-40. 2007.

FERREIRA, C. L.de L. F. **Relevância da utilização de soro e leiteiro na indústria de laticínios**. Indústria de Laticínios. set/out. p. 39-40, 1997.

GONZÁLEZ SISO, M. I. **The biotechnological utilization of cheese whey: a review**. Great Britain: Published by Elsevier Science Limited. 1996.

MENDONÇA, D. B; ADRIANO, W. S; GIORDANO, R. L. C. **Determinação dos parâmetros cinéticos e de transporte de massa na hidrólise das proteínas do soro de queijo com tripsina imobilizada em quitosana**, In: XVI Congresso Brasileiro de Engenharia Química, Santos, São Paulo, 2006.

NEJAD Z. G., Yaghmaei S. and Hosseini R. H., 2010, **Production of Extracellular Protease and Determination of Optimise Condition by *Bacillus licheniformis* BBRC 100053**. Chemical Engineering Transactions, 21, 1447-1452.

ORTEGA N., Perez-Mateos M., Pilar M.C. and Busto M.D., 2009, **Neutrase immobilization on alginate-glutaraldehyde beads by covalent attachment**. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 57, 109-115.

PACHECO A.M., Gondim D.R. and Gonçalves L.R.B., 2009, **Ethanol Production by Fermentation Using Immobilized Cells of *Saccharomyces cerevisiae* in Cashew Apple Bagasse**. Applied Biochemistry and Biotechnology, 161, 209-217.

PONSANO, E. H.; PINTO, M. F.; CASTRO-GOMEZ, R. J. H. **Soro de leite – obtenção, características e aproveitamento: revisão**. Semina: Ci. Agr., v.13, n.1, p. 92-96, 1992.

RICHARDS, N. S. P.S. **Emprego racional do soro láctico**. Indústria de Laticínios. mai/jun, p. 67-69, 1997.

ROCHA M.V.P., Rodrigues T.H.S., Macedo G.R. and Gonçalves L.R.B., 2009, **Enzymatic Hydrolysis and Fermentation of Pretreated Cashew Apple Bagasse with Alkali and Diluted Sulfuric Acid for Bioethanol Production**. Applied Biochemistry Biotechnology, 155,407–417.

RODRIGUES D. S., Mendes A. A., Adriano W. S., Gonçalves L. R. B. and Giordano R. L.C., 2008, **Multipoint covalent immobilization of microbial lipase on chitosan and agarose activated by different methods**. Journal of Molecular Catalysis. B, Enzymatic, 51, 100-109.

SANTOS R.P., Santiago A.A.X., Gadelha C.A.A., Cajazeiras J.B., Cavada B.S., Martins J.L., Oliveira T.M., Bezerra G.A., Santos R.P. and Freire V.N., 2007, **Production and characterization of the cashew (*Anacardium occidentale* L.) peduncle bagasse ashes**. Journal of Food Engineering, 79,1432–1437.

SCHMID, A.; HOLLMAN, F.; PARK, B. J.;BUHLER, B. **The use of enzymes in the chemical industry in Europe**. Current Opinion in Biotechnology, v.13, p.359- 366, 2002.

SCHMIDT, D.G.; POLL, J. K. Enzymatic hydrolysis of whey proteins. **Hydrolysis of  $\alpha$ -lactoalbumin and  $\beta$ -lactoglobulin in buffer solution by proteolytic enzymes**. Neth. Milk Dairy Journal, v.45, p.225-240, 1991.

TARDIOLI. P.W. **Hidrólise controlada de proteínas do soro de queijo usando Carboxipeptidase A e Alcalase® imobilizadas multipontualmente em agarose**. (Doutorado). Engenharia Química, UFSCAR, São Carlos, 2003.

---

*Capítulo 4*

*Artigos Derivados da Tese:*

*L-arabinose isomerase*

---

## IMOBILIZAÇÃO DA L-ARABINOSE ISOMERASE EM SUPORTE DE BAIXO CUSTO À BASE DE QUITOSANA

G.C.B. CHINELATE<sup>1</sup>, R. MANZO<sup>2</sup>, J. E. MAMMARELLA<sup>2</sup>,  
W. S. ADRIANO<sup>3</sup> e L. R. B. GONÇALVES<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal Rural de Pernambuco, <sup>2</sup>Universidade Federal de Campina Grande, <sup>3</sup>Universidad Nacional del Litoral, Intec, Universidade Federal do Ceará  
E-mail para contato: lrg@ufc.br

### RESUMO

D-tagatose, um epímero de D-frutose está atualmente a ser introduzido como um adoçante de baixas calorias. A doçura e sabor de D-tagatose é equivalente à sacarose, mas o valor calórico é ~30% do conteúdo de energia da sacarose. Estudos fisiológicos do seu índice glicêmico demonstrado que a D-tagatose não provocam qualquer aumento nos níveis de glucose no sangue, tornando-o seguro para pacientes que sofrem de diabetes, e, ao contrário da sacarose, que não promove a cárie dentária. D-tagatose recentemente obteve aprovação regulatória como classificado como seguro ("GRAS – generally recognized as safe"), devido a seus notáveis benefícios à saúde, nos Estados Unidos. Devido à complexidade e aos baixos rendimentos do método de produção por via química e às implicações ambientais, vários grupos de pesquisa têm tentado desenvolver um processo catalisado por enzima para a produção de D-tagatose. Tem sido usada a L-arabinose isomerase (EC 5.1.3.4). Assim, o objetivo deste trabalho foi estudar as melhores condições de atividade desta enzima em sua forma solúvel e desenvolver protocolo de imobilização em suporte versátil e barato como quitosana-alginato epoxilado. Soluções de enzima em tampão de acetato de sódio, citrato de sódio e fosfato de sódio, na faixa de pH variando de 3,8 a 8,5 mantendo-se sob agitação a 25°C e 50°C. As melhores condições de atividade da L-arabinose isomerase solúvel apresentaram com tampão acetato pH 5,5, tampão citrato pH 5,5, tampão fosfato pH 7,5 e 8,0 com. Os derivados foram analisados quanto ao rendimento da imobilização (RI), atividade recuperada (ARec), tempo de meia-vida ( $t_{1/2}$ ) e fator de estabilização térmica a 75°C (FE), comparados com a enzima solúvel. Em imobilizações em pH 8,0 apresentaram maior RI em tampão fosfato 50 mM após 24h, com 90,21% de ARec, em temperatura de 25°C,  $t_{1/2}$  de 44h a 75°C, perda de 4,45% na atividade durante o estudo de estabilidade operacional com 10 ciclos e perda de 1,83% da atividade durante 90 dias de estocagem quando comparados com pH mais baixos, em reatores descontínuos.

**Palavras-chave:** l-arabinose isomerase, imobilização, quitosana-alginato epoxilado

## ABSTRACT

D-tagatose, an epimer of D-fructose is currently being introduced as a low calorie sweetener. The flavor and sweetness of D-tagatose is equivalent to sucrose but the calorific value is ~ 30% of the energy content of sucrose. Physiological studies of their Glycemic Index demonstrated that D-tagatose not cause any increase in blood glucose levels, making it safe for patients with diabetes and, unlike sucrose which does not promote tooth decay. D-tagatose has obtained regulatory approval as recently classified as safe ("GRAS - Generally Recognized as safe") due to its remarkable health benefits in the United States. Due to the complexity and low yield of the production method by chemical and environmental implications, many research groups have tried to develop an enzyme catalyzed process for the production of D-tagatose. It has been used as L-arabinose isomerase (EC 5.1.3.4). The objective was to study the best conditions of activity of this enzyme in soluble form and develop protocol for immobilization support versatile and cheap as chitosan-alginate epoxytated. Solutions of enzyme in buffer sodium acetate, sodium citrate and sodium phosphate, at pH ranging from 3.8 to 8.5 keeping under stirring at 25 ° C and 50 ° C. The best conditions for the activity of L-arabinose isomerase soluble presented with acetate buffer pH 5.5 citrate buffer pH 5.5 phosphate buffer with pH 7.5 and 8.0. The derivatives were analyzed for yield of immobilization (RI), activity recovered (AREC), half-life ( $t_{1/2}$ ) and thermal stabilization factor at 75 ° C (FE), compared with the soluble enzyme. In fixed at pH 8.0 showed higher RI in 50 mM phosphate buffer after 24 hours, with 90.21% of AREC, at 25 ° C,  $\frac{1}{2}$  of 44h at 75 ° C, 4.45% loss in activity during the stability study operating with 10 cycles and 1.83% loss of activity during 90 days of storage when compared with lower pH in batch reactors.

**Keywords:** L-arabinose isomerase, immobilization, chitosan-alginate epoxytated

## 1. INTRODUÇÃO

D-tagatose ou tagatose é uma ceto-hexose em que seu quarto é um carbono quiral e sua imagem-espelho do respectivo átomo de carbono da frutose. A fórmula empírica para D-tagatose é  $C_6H_{12}O_6$  e seu peso molecular é 180,16. D-tagatose é um adoçante a granel de baixa caloria com as seguintes propriedades: possui 92% da doçura da sacarose, tem um valor calórico reduzido, é um não-cariogênico, é considerado uma substância prebiótica, possuindo também um potencial realçador de sabor. Tem sido usado como um novo adoçante funcional no mercado de suplementos nutricionais e foi classificado como seguro ("GRAS – generally recognized as safe"), devido a seus notáveis benefícios à saúde (LEVIN, 2002). A D-tagatose é semelhante quanto ao sabor e propriedades físicas à sacarose, porém possui um valor calórico muito menor de 1,5 kcal.g<sup>-1</sup>(KIN, 2004). Não promove a

cárie dentária ou provoca qualquer aumento dos níveis sanguíneos de glicose (JORGENSEN, 2004) e é também útil na redução dos sintomas associados com diabetes tipo II, hiperglicemia, anemia, e hemofilia (KIN, 2004). Este epímero da D-frutose e da cetohexose correspondente a D-galactose, está sendo introduzido como um adoçante de baixa caloria (LEVIN, 2002). Por estas razões, a D-tagatose recebeu considerável atenção comercial em anos atuais.

Como não existe uma fonte abundante de Tagatose na natureza, uma alternativa viável para produzir este adoçante é através da isomerização enzimática de D-galactose pela enzima *L-arabinose isomerase* (L-AI) (HALTRICH *et al.*, 1998; IZUMORI *et al.*, 1978; JORGENSEN *et al.*, 2004; MANZONI *et al.*, 2001). Um método para a conversão química de galactose em tagatose já foi desenvolvido e comercializado (BEADLE *et al.*, 1991), mas este processo químico tem algumas desvantagens, tais como complexas etapas de purificação e a formação de resíduos químicos.

A D-tagatose poderia ser sintetizada a partir do soro oriundo da produção de queijos, através da hidrólise da lactose obtendo galactose, por métodos químicos ou biológicos. Utilizando catalisador de cálcio e ácido forte, a produção em massa de D-tagatose foi aplicada pela primeira vez em aplicação prática através de catálise química (BEADLE, 1991). No entanto, este método não pode cumprir normas como uma tecnologia pró-ambiental exigida e tem alguns inconvenientes (OH, 2007). Verificou-se que a *L-arabinose isomerase* é a enzima mais eficiente para isomerizar D-galactose em D-tagatose (CHEETHAM, 1993). Os processos biológicos para a produção de D-tagatose têm sido estudados intensivamente nos últimos anos pela L-AI isomerizando a D-galactose. A L-AI pode ser usada para produzir D-tagatose a partir de D-galactose usando a estratégia *Izumoring* (IZUMORI, 2006), devido à semelhança estrutural entre a L-arabinose e D-galactose.

A imobilização de biocatalisadores é uma estratégia que pode ser utilizada para a condução de bioprocessos em situações variadas. De uma forma geral, busca-se, com a imobilização, propiciar o uso de enzimas ou células por períodos prolongados através de processos contínuos ou semicontínuos. A ligação por meio de adsorção é um método simples e barato, sendo a principal desvantagem a vulnerabilidade de perda dos biocatalisadores imobilizados para o meio reacional. Para aumentar a massa de biocatalisadores imobilizados, suportes porosos têm sido

geralmente utilizados, permitindo a ligação do biocatalisador também à estrutura superficial interna (CARVALHO *et al.*, 2006).

Como suporte para imobilização de enzima, materiais a base de quitina e quitosana são utilizados sob a forma de pó, flocos e géis de diferentes configurações geométricas (KRAJEWSKA, 2004). Estes polímeros naturais apresentam vantagens em relação aos sintéticos por terem menos limitações quanto à biodegradação e biocompatibilidade. Entretanto, podem exibir uma limitação em suas reatividades e processamentos (ADRIANO, 2008). Como fonte, têm-se as carapaças de crustáceos que são resíduos abundantes e rejeitados pela indústria pesqueira que, em muitos casos, as consideram poluentes. Sua utilização reduz o impacto ambiental causado pelo acúmulo nos locais onde é gerado ou estocado (MENDES *et al.*, 2011).

Desde que o método de conversão enzimática de D-Galactose em D-Tagatose pela *L-arabinose isomerase*, várias Arabinoses Isomerases (AI) vem sendo identificadas para a produção de D-Tagatose. Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi caracterizar a atividade da *L-arabinose isomerase* e investigar a imobilização da mesma em microesferas de quitosana-alginato epoxiladas e sua utilização na produção de D-Tagatose.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Material

O extrato enzimático de *L-arabinose isomerase* foi produzido por cepas selvagens de *Lactobacillus latis* subsp. *latis* CRL63 no Instituto de Desarrollo Tecnológico para la Industria Química, UNL-CONICET, Santa Fe – Republica Argentina, apresentando pH 5,73, concentração de proteína 22,76 mg.mL<sup>-1</sup>. A Quitosana em pó com grau de desacetilação de 85,9% foi adquirida junto a Polymar Ind. Ltda. (Fortaleza, Ceará-Brasil). Os demais reagentes utilizados foram adquiridos de diversas marcas comerciais com grau analítico laboratorial.

## 2.2 Métodos

### 2.2.1 Determinação de Proteínas

A concentração de proteínas foi determinada por método colorimétrico utilizando curva de calibração com o padrão de albumina de soro bovino (BSA) válida em uma concentração de 0,0 a 0,6 g.L<sup>-1</sup>(BRADFORD, 1976).

### 2.2.2 Determinação da atividade da *L-arabinose isomerase*

A atividade da L-AI solúvel e imobilizada foi determinada utilizando como substrato uma solução de D-Galactose 0,5 M em tampões acetato, citrato e fosfato 25 mM, adicionado de MnCl<sub>2</sub> 5mM, à 50°C, por 5 horas. A quantidade de cetohexose produzida foi medida por uma reação colorimétrica conforme descrito por Dische e Borenfreund (1951) em espectrofotômetro Genesys 20, Thermo Scientific, a 560 nm.

Uma unidade de *L-arabinose isomerase* foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 µmol de D-tagatose por minuto nas condições descritas acima. A atividade foi calculada de acordo com a equação abaixo:

$$At (U/mL) = \frac{[TAG](mg/mL) \times V (mL)}{T (min) \times VE (mL)} \quad (1)$$

sendo [TAG] (concentração de d-Tagatose); V (volume do reator); T (tempo de reação de isomerização); VE (volume de enzima).

### **2.2.3 Determinação das condições ótimas de Isomerização de D-galactose catalisada por L-AI livre**

Inicialmente, avaliaram-se as condições ótimas para a determinação da atividade da enzima L-AI. Para tal fim, determinou-se a atividade enzimática em função do pH (na faixa de 3,8 a 8,5), da temperatura (25°C e 50°C) e da solução tampão (tampão acetato, tampão citrato e tampão fosfato).

### **2.2.4 Preparo do Suporte de Imobilização**

O suporte utilizado para a imobilização por adsorção da L-AI foi quitosana-alginato-epoxilado 2,5% (m/m), conforme metodologia descrita por ADRIANO (2008).

### **2.2.5 Imobilização da L-AI em quitosana-alginato-epoxilado**

A imobilização em 1 g de suporte de quitosana-alginato-epoxilado 2,5% (m/m) seguiu-se da adição de 100 µL de uma solução enzimática de L-AI em tampão acetato, citrato ou fosfato a 25 mM e pH de 5,5; 5,5; 7,5 e 8,0, respectivamente, a 25°C, sob leve agitação. A carga oferecida foi de 26,7 mg de proteína/g de suporte. Foram avaliados parâmetros da imobilização nos tempos de 5 min, 5h e 24h de imobilização. Ao final os derivados obtidos foram lavados com água destilada para eliminação de enzima residual e seca em bomba a vácuo.

Alíquotas da solução enzimática sobrenadante no início (branco) e ao término da imobilização foram retiradas para a quantificação da atividade de isomerização inicial e residual. As Equações 2, 3 e 4 foram utilizadas para a realização dos cálculos dos parâmetros de imobilização, como rendimento de imobilização (RI), atividade teórica ( $A_{t_{teórica}}$ ) e atividade de recuperada ( $A_{t_{recuperada}}$ ):

$$RI(\%) = \frac{At_0 (U/mL) - At_{res} (U/mL)}{At_0 (U/mL)} \times 100 \quad (2)$$

sendo  $At_0$  (atividade oferecida no início da imobilização) e  $At_{res}$  (atividade residual presente no sobrenadante após a imobilização),

$$At_{teórica}(U/g) = \frac{At_0 (U/mL) \times C_{oferecida} (mg/g)}{[P] (mg/mL)} \times RI \quad (3)$$

sendo  $At_0$  (atividade oferecida no início da imobilização);  $C_{oferecida}$  (Carga enzimática oferecida);  $[P]$  (Concentração de proteínas no extrato) e  $RI$  (Rendimento de imobilização, sendo 1,0 referente a 100%),

$$At_{recuperada}(\%) = \frac{At_{derivado} (U/g)}{At_{teórica} (U/g)} \times 100 \quad (4)$$

sendo  $At_{derivado}$  a atividade de isomerização aparente do derivado.

### 2.2.6 Estabilidade Térmica da L-AI solúvel e imobilizada

Para a determinação da estabilidade térmica da enzima solúvel, foram preparadas soluções das enzimas e incubadas em frascos fechados a 75°C. Para medir a inativação térmica nas condições de ensaio, alíquotas eram coletadas em intervalos de tempo pré-determinados, colocadas imediatamente em banho de gelo e suas atividades determinadas. Suspensões com derivado de L-AI imobilizada foram incubadas em frascos fechados a 75°C. De acordo com a velocidade de inativação térmica nas condições de ensaio, alíquotas eram coletadas em intervalos de tempo pré-determinados, colocadas imediatamente em banho de gelo e suas atividades determinadas.

Para cada ensaio, as constantes do modelo de desativação proposto por Sadana e Henley (1987), equação 5, foram estimadas através de ajuste não linear aos dados experimentais. O tempo de meia-vida ( $t_{1/2}$ ) foi calculado a partir da constante de desativação, (equação 6). Fatores de estabilização (FE) foram obtidos como a razão entre as meias-vidas da enzima imobilizada e enzima solúvel, equação 7.

$$AR = (1 - \alpha) \times e^{-kd \times t} + \alpha \quad (5)$$

$$t_{1/2} = \frac{\ln(0,5 - \alpha)}{k_d \times (1 - \alpha)} \quad (6)$$

$$FE = \frac{t_{1/2 \text{ derivado}}}{t_{1/2 \text{ enzima}}} \quad (7)$$

sendo AR a atividade relativa,  $kd$  a constante de desativação térmica,  $\alpha$  a fração da enzima que perde atividade,  $t$  é o tempo em que a amostra permaneceu sob condição de temperatura e FE o fator de estabilidade térmica.

### 2.2.7 Estabilidade Operacional da L-AI imobilizada

A estabilidade operacional da enzima imobilizada foi realizada submetendo o biocatalisador (1 g) a ciclos subsequentes de produção de D-Tagatose a partir de D-galactose a 50 mM. A reação foi realizada em um reator descontínuo, mantido a 25°C, por 48 h, sob agitação constante. O volume de reação foi de 10 mL. Antes de cada novo ciclo, o biocatalisador foi lavado para remover os produtos e substratos que não reagiram.

### **2.2.8 Estabilidade de Estocagem da L-AI imobilizada**

Para avaliar a estabilidade de armazenamento da enzima imobilizada, os melhores derivados foram armazenados úmidos, suspensos em tampão a 5°C e as suas atividades residuais foram determinadas em tempos pré-estabelecidos, em um intervalo de 90 dias.

## **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Verificou-se a influência do pH e temperatura sobre a atividade da L-AI solúvel, como também imobilizada, através da reação de isomerização de galactose. Atividade relativa foi definida como a razão entre a atividade inicial enzimática medida a uma determinada temperatura e a atividade inicial enzimática máxima.

### **3.1 Estudo da estabilidade da L-AI solúvel**

O sistema reacional para a caracterização da L-AI solúvel continha 0,5 M de D-Galactose, 1 mM de  $MnCl_2$  em 50 mM de tampão. Para avaliar a influência do pH na atividade enzimática da L-AI solúvel, o valor do pH variou de 3,8 a 8,5 com três diferentes tampões à temperaturas de 25 e 50°C.

Em tampão acetato as medidas foram realizadas em pH de 3,8 a 6,0 (Tabela 15). À temperatura de 25°C, as atividades da L-AI solúvel variaram de 1,69 a 22,40 U/mL em tempo de 5 min. Em 5h, as atividades em tampão acetato variaram de 5,22 a 23,86 U/mL. A melhor atividade a temperatura de 25°C foi em pH 5,5 com 23,86 U/mL após 5 horas de isomerização. Nestas condições, houve diferença significativa entre os dois tempos de reação para a produção de D-Tagatose.

À temperatura de 50°C, as atividades da L-AI solúvel variaram de 14,76 a 23,37 U/mL em tempo de 5 min; em 5h, as atividades em tampão acetato variaram de 18,75 a 28,79 U/mL. A melhor atividade a temperatura de 50°C foi em pH 5,5 com

28,79 U/mL após 5 horas de reação, havendo diferença significativa na determinação da atividade da L-AI solúvel entre os tempos estudados.

Tabela 15. Atividades da L-arabinose isomerase solúvel (U/mL) em tampão acetato.<sup>1</sup>

pH	Atividades (U/mL)			
	25°C		50°C	
	5min	5h	5min	5h
3,8	1,69 <sup>a</sup> ±0,01	5,22 <sup>b</sup> ±0,08	14,76 <sup>A</sup> ±0,03	18,75 <sup>B</sup> ±0,02
4,0	13,24 <sup>a</sup> ±0,11	17,76 <sup>b</sup> ±0,02	15,24 <sup>A</sup> ±0,39	19,37 <sup>B</sup> ±0,43
5,3	20,00 <sup>a</sup> ±0,02	20,52 <sup>a</sup> ±0,04	20,02 <sup>A</sup> ±0,01	23,18 <sup>B</sup> ±0,07
5,5	22,40 <sup>a</sup> ±0,01	23,86 <sup>b</sup> ±0,32	23,37 <sup>A</sup> ±0,15	28,79 <sup>B</sup> ±0,31
5,8	20,79 <sup>a</sup> ±0,02	20,18 <sup>a</sup> ±0,14	21,04 <sup>A</sup> ±0,08	24,99 <sup>B</sup> ±0,24
6,0	19,89 <sup>a</sup> ±0,01	17,90 <sup>b</sup> ±0,09	20,04 <sup>A</sup> ±0,10	23,31 <sup>B</sup> ±0,01

<sup>1</sup>Numa mesma linha, letras iguais e do mesmo formato não diferem significativamente entre si ( $p > 0,05$ ).

Em tampão citrato as medidas também foram realizadas no intervalo de pH de 3,8 a 6,0, variando a temperatura de 25°C e 50°C (Tabela 16). Em temperatura ambiente, as atividades variaram de 4,22 a 21,76 U/mL em tempo de 5 min e após 5h, as atividades em tampão acetato aumentaram, variando de 5,29 a 23,20 U/mL na faixa de pH estudada. A melhor atividade a temperatura de 25°C foi em pH 5,5 com 23,20 U/mL.

À temperatura de 50°C, as atividades da L-AI solúvel variaram de 9,75 a 17,58 U/mL em tempo de 5 min; em 5h, as atividades em tampão acetato variaram de 12,08 a 22,25 U/mL. A melhor atividade a temperatura de 50°C foi em pH 5,5 com 22,25 U/mL.

Tabela 16. Atividades da L-arabinose isomerase solúvel (U/mL) em tampão citrato.<sup>1</sup>

pH	Atividades (U/mL)			
	25°C		50°C	
	5min	5h	5min	5h
3,8	4,22 <sup>a</sup> ±0,41	5,29 <sup>b</sup> ±0,01	13,58 <sup>A</sup> ±0,61	16,97 <sup>B</sup> ±0,05
4,0	9,41 <sup>a</sup> ±0,72	20,44 <sup>b</sup> ±0,31	16,76 <sup>A</sup> ±0,01	17,04 <sup>A</sup> ±0,12
5,3	17,23 <sup>a</sup> ±0,22	17,31 <sup>a</sup> ±0,52	16,52 <sup>A</sup> ±0,92	16,92 <sup>A</sup> ±1,00
5,5	21,76 <sup>a</sup> ±0,03	23,20 <sup>b</sup> ±0,08	17,58 <sup>A</sup> ±0,20	22,25 <sup>B</sup> ±0,68
5,8	16,96 <sup>a</sup> ±0,10	20,13 <sup>b</sup> ±0,22	13,25 <sup>A</sup> ±0,11	13,31 <sup>A</sup> ±0,04
6,0	17,63 <sup>a</sup> ±0,02	17,96 <sup>a</sup> ±0,03	9,75 <sup>A</sup> ±0,67	12,08 <sup>B</sup> ±0,06

<sup>1</sup>Numa mesma linha, letras iguais e do mesmo formato não diferem significativamente entre si ( $p > 0,05$ ).

Comparando-se os dois primeiros tampões estudados, pôde-se observar que melhores resultados foram em pH 5,5 para a atividade da L-arabinose isomerase solúvel à 50°C. Porém, em valores de atividade, o tampão acetato, apresentou resultado maior (28,79 U/mL).

Em tampão fosfato (Tabela 17) a 25°C as atividades variaram de 32,03 a 38,22 U/mL em tempo de 5 min. Em 5h, as atividades variaram de 32,20 a 38,60 U/mL. A melhor atividade a temperatura de 25°C foi em pH 8,0 com 38,60 U/mL. À temperatura de 50°C, as atividades da L-AI solúvel variaram de 33,39 a 38,44 U/mL em tempo de 5 min; em 5h, as atividades em tampão fosfato variaram de 33,03 a 38,60 U/mL.

Nestas condições não houveram diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre as atividades medidas em tempo de 5 minutos e 5 horas de isomerização da D-Galactose em D-Tagatose. Este fato pode ser entendido como a faixa melhor de determinação da atividade da L-AI solúvel estar justamente entre pH 7,0 e 8,5.

Comparando as temperaturas de reação, também não houveram diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre os resultados mensurados.

Tabela 17. Atividades da L-arabinose isomerase solúvel (U/mL) em tampão fosfato.<sup>1</sup>

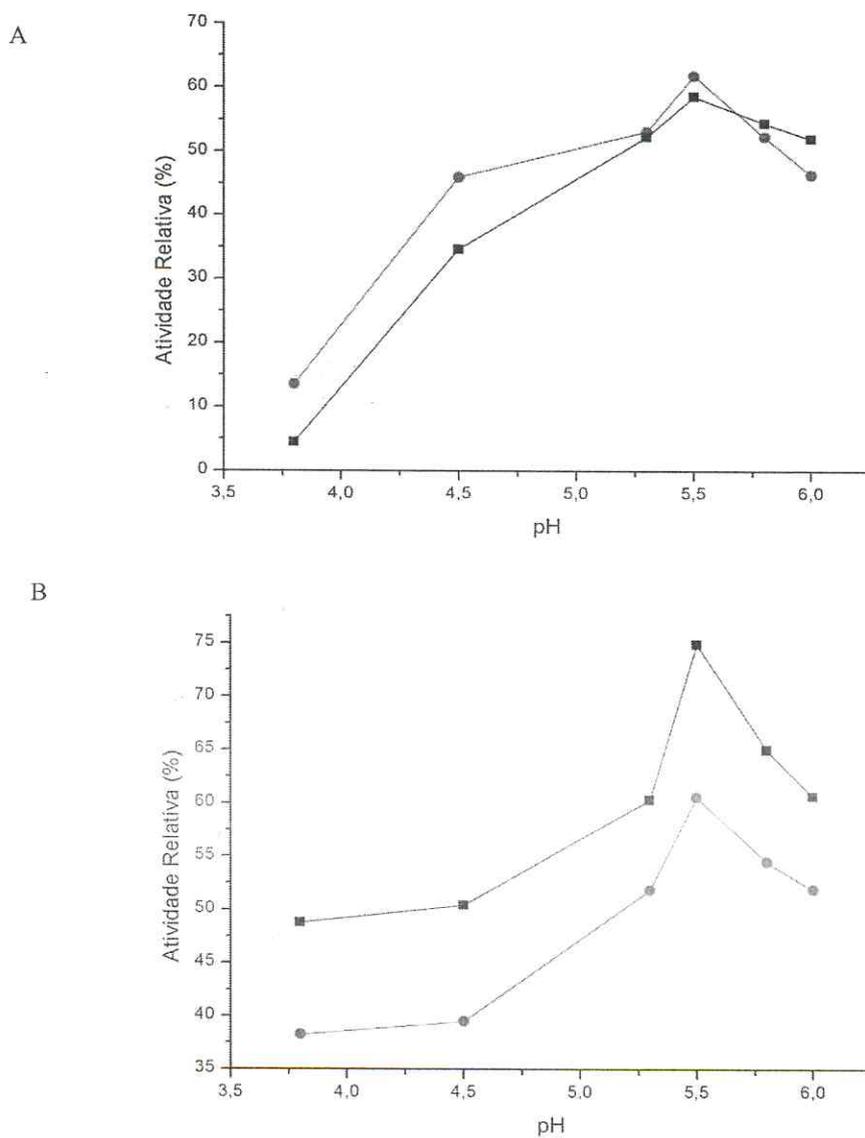
pH	Atividades (U/mL)			
	25°C		50°C	
	5min	5h	5min	5h
7,0	33,34 <sup>a</sup> ±0,02	33,58 <sup>a</sup> ±0,01	33,39 <sup>A</sup> ±0,21	33,51 <sup>A</sup> ±0,35
7,5	33,52 <sup>a</sup> ±0,46	33,96 <sup>a</sup> ±0,01	34,35 <sup>A</sup> ±0,01	34,59 <sup>A</sup> ±0,09
8,0	38,22 <sup>a</sup> ±0,01	38,60 <sup>a</sup> ±0,16	38,44 <sup>A</sup> ±0,01	38,61 <sup>A</sup> ±0,10
8,5	32,03 <sup>a</sup> ±0,02	32,20 <sup>a</sup> ±0,20	32,99 <sup>A</sup> ±0,01	33,04 <sup>A</sup> ±0,08

<sup>1</sup>Numa mesma linha, letras iguais e do mesmo formato não diferem significativamente entre si ( $p > 0,05$ ).

A melhor atividade a temperatura de 50°C foi em pH 8,0 com 38,60 U/mL (Figura 20B). Na avaliação das condições para atividade da *L-arabinose isomerase* solúvel de *Lactobacillus latis* subsp. *latis*, o pH ótimo 8,0 em tampão fosfato a 50°C no tempo de 5h e a atividade relativa manteve-se acima de 85% entre pH 7,0 e 8,5 nestas condições, também observado por Liang et al. (2012) para L-AI oriunda da *Thermoanaerobacter mathranii* (TMAI), apresentando 80% de atividade relativa em pH 8,0 a 60°C, enquanto que Xu (2011) para L-AI de *Lactobacillus fermentum*, apresentando 90% de atividade relativa em pH entre 5,0 e 7,0 a 65°C.

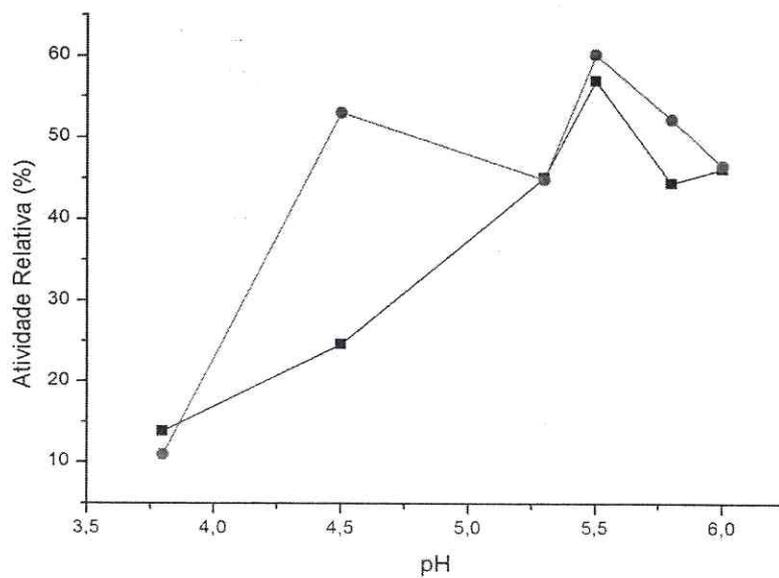
Considerando as melhores condições de catalisação da reação de isomerização da D-Galactose em D-Tagatose em pH 8,0 após 5 horas de reação tanto em temperatura de 25°C como em temperatura de 50°C, 38,60U/mL e 38,61 U/mL, respectivamente, calcularam-se as medidas de Atividade Relativa de todas as convenções analisadas, conforme demonstram as Figuras 18 , 19 e 20.

Figura 17. Efeitos do pH e da temperatura na atividade relativa da L-AI solúvel em 5 min (■) e 5h (●), em tampão acetato a 25°C (A) e a 50°C (B). Atividade relativa de 100% correspondente ao maior valor bruto em U/mL.



**Figura 18.** Efeitos do pH e da temperatura na atividade relativa da L-Al solúvel em 5 min (■) e 5h (●), em tampão citrato a 25°C (A) e a 50°C (B). Atividade relativa de 100% correspondente ao maior valor bruto em U/mL.

A



B

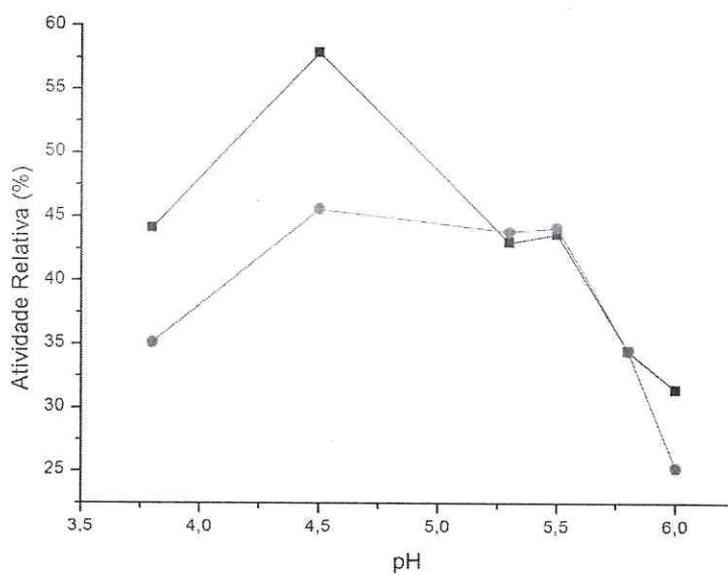
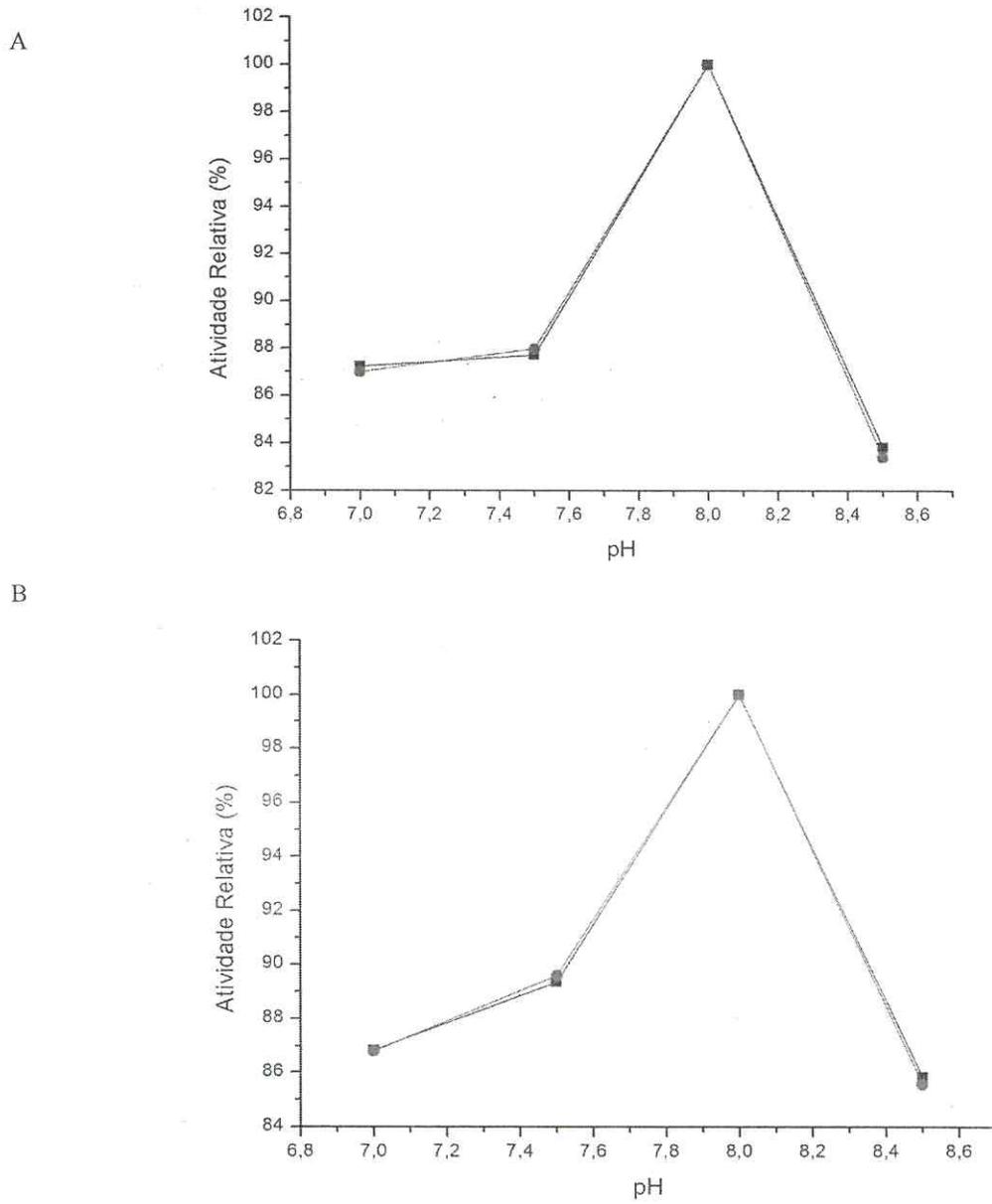


Figura 19. Efeitos do pH e da temperatura na atividade relativa da L-Al solúvel em 5 min (■) e 5h (●), em tampão fosfato a 25°C (A) e a 50°C (B). Atividade relativa de 100% correspondente ao maior valor bruto em U/mL.



Li e Zhu (2011) encontraram atividade relativa máxima em pH 9,5-10,5 a 95°C para L-AI de *Anoxybacillus flavithermus* (AFAI); Cheng (2010) obtiveram resultados máximos em tampão fosfato em pH 7,5 a 65°C para L-AI *Bacillus stearothermophilus* IAM 11001 e Rhimi (2007), pH 7,5 a 80°C para L-AI de *Bacillus stearothermophilus* US100. Já Zhang (2010) otimizou em tampão Tris-HCL em pH 7,5 para *L-arabinose isomerase* de *Bacillus licheniformis* (BL-AI).

Os resultados da isomerização da D-Galactose comprovam o efeito do pH sobre a ação da enzima L-arabinose isomerase, onde suas melhores atividades foram detectadas em pH 7,5 e 8,0 em tampão fosfato.

### **3.2 Imobilização da L-AI em suporte de Quitosana-Alginato-Epoxilado**

Com o objetivo de desenvolver um biocatalisador para reutilização e redução de custos com o processo contínuo de produção de D-Tagatose, utilizou-se o suporte de Quitosana-Alginato-Epoxilado a 2,5% (m/m) devido ao baixo tempo necessário para imobilização e o número de ligações enzima-suporte não serem muitas e, quanto melhor o arranjo da ligação entre as moléculas das proteínas e do suporte, maiores são as possibilidades de estabilização será atingida (ADRIANO, 2008b).

Para a avaliação dos parâmetros da imobilização, definiram-se as condições de adsorção conforme as melhores condições de atividade da L-AI solúvel em todos os tampões avaliados, de acordo com o que se apresentam na Tabela 18.

Segundo os resultados obtidos nos ensaios de imobilização da L-AI em quitosana-alginato epoxilado 2,5%, nos quais apresentaram a influência do pH em relação ao rendimento de imobilização para os derivados obtidos em condições específicas. Pôde-se observar que a otimização da imobilização apresentou-se no pH 8,0 em tampão fosfato 50 mM, com 90,22% de rendimento da imobilização (RI) e 80,67% de atividade recuperada (ARec) após 24 horas de imobilização em temperatura de 25°C.

Tabela 18. Parâmetros de imobilização de *L-arabinose isomerase* em suportes de quitosana-alginato epoxilado 2,5% (m/m). Carga oferecida de 2,28 mg de proteína.g<sup>-1</sup>gel, após 5 min, 5h e 24 h de contato enzima-suporte. Sendo (RI) rendimento de imobilização, (ARec) atividade recuperada, (A<sub>TI</sub>) atividade teórica de imobilização e (AAP) atividade aparente do derivado.

Ensaio	RI (%)			ARec (%)			A <sub>TI</sub> (U . g <sup>-1</sup> suporte)			AAP (U . g <sup>-1</sup> suporte)		
	5min	5h	24h	5min	5h	24h	5min	5h	24h	5min	5h	24h
1	44,30	80,67	84,96	72,76	79,19	79,60	10,57	19,24	20,27	7,69	15,23	16,13
2	35,40	52,78	58,68	62,43	66,03	77,94	13,66	20,37	22,65	8,53	13,45	17,65
3	56,96	78,20	79,38	59,33	76,00	80,67	19,70	27,04	27,45	11,69	20,55	22,14
4	57,82	88,07	90,22	61,33	74,13	80,67	22,32	34,00	34,83	13,69	25,20	28,10

Ensaio: (1) Tampão Acetato 50 mM /pH 5,5, (2) Tampão Citrato 50 mM /pH 5,5, (3) Tampão Fosfato 50 mM/pH 7,5 e (4) Tampão Fosfato 50 mM /pH 8,0.

Conforme os resultados obtidos nos ensaios de imobilização da L-AI em quitosana-alginato epoxilado 2,5%, apresentaram a influência do pH em relação ao rendimento de imobilização para os derivados obtidos em condições específicas.

A imobilização da *L-arabinose isomerase* em tampão acetato 50mM e pH 5,5 apresentou aumento do rendimento da imobilização de 82,10% entre o período de 5 minutos e 5 horas e 5,32% entre 5 horas e 24 horas de exposição da enzima solúvel ao suporte. Houve um aumento de 8,84% na atividade recuperada no primeiro período de imobilização, o que caiu para 5,17% entre 5 e 24 horas. Para as condições de pH 5,5 em tampão citrato 50mM, apresentou um aumento no RI 49% nas primeiras 5 horas de imobilização e 11,18% após 24 horas. Para a atividade recuperada, houve um aumento sutil de 5,76% nas primeiras 5 horas e, após o segundo período de imobilização, 8,04%. Das condições de imobilização estudadas, esta apresentou menor RI e ARec ao final das 24 horas. Já em tampão fosfato 50 mM, pH 7,5 houve um aumento de 37,29% e um sutil aumento de 1,51% nas primeiras 5 horas e 24 horas respectivamente. Em 5 minutos de imobilização, apresentou a menor atividade recuperada, quando comparado com os demais

ensaios (59,33%), porém houve um aumento de 28,09% após 5 horas e mais 6% após 24 horas de imobilização. Pôde-se observar que a otimização da imobilização da L-AI apresentou-se no pH 8,0 em tampão fosfato 50 mM, com 90,22% de rendimento da imobilização (RI) e 80,67% de atividade recuperada (ARec) após 24 horas de imobilização em temperatura de 25°C. Estudos de imobilização da *L-arabinose isomerase* em outros suportes como pérolas de quitosana e alginato (LIM, 2008) foram otimizados em tampão fosfato e pH 7,5; Zhang et al. (2010) imobilizaram BL-AI em tampão Tris-HCl 20 mM em pH 7,5 com o melhor rendimento de imobilização de 73,2% para suporte com concentração de 1,8% de alginato; em imobilizações por adsorção em suporte de aminopropil modificados com 25% de glutaraldeído, foram carregados em tampão fosfato 50 mM com pH 7,0 por 24h apresentando RI de 146,13% a 25°C (ZHANG, 2011).

### 3.3 Estabilidade Térmica da *L-arabinose isomerase* solúvel e imobilizada

A estabilidade térmica da L-AI solúvel e imobilizada foram investigadas à temperatura de 75°C, conforme mencionado por Lim (2008), Zhang (2011) e Liang (2012), e demonstrados a Tabela 19 e os gráficos a seguir.

Tabela 19. Valores estimados para as constantes de desnaturação térmica ( $K_d$ ), em função da temperatura de 75°C, aplicando modelo de Sadana e Henley (1987).

Tampão/pH	<i>L-arabinose isomerase</i>	Sadana e Henley (1987)			$t_{1/2}$ (min.)	FE
		$K_d$	$\alpha$	$R^2$		
Acetato, pH 5,5	Solúvel	0,0025	0,3590	0,95475	300	2,40
	Imobilizada	0,0012	0,8258	0,97041	720	
Citrato, pH 5,5	Solúvel	0,0035	0,2846	0,99247	210	2,28
	Imobilizada	0,0021	0,2218	0,99952	480	
Fosfato, pH 7,5	Solúvel	0,0008	1,1691	0,90089	1080	2,44
	Imobilizada	0,0003	0,4842	0,97151	2640	
Fosfato, pH 8,0	Solúvel	0,0007	1,2635	0,90428	1200	2,25
	Imobilizada	0,0004	0,4692	0,97729	2700	

Figura 20. Estabilidade Térmica da L-Al solúvel (■) e imobilizada (◆) a 75°C, no tampão acetato, pH 5,5. As curvas representam a aproximação do modelo de Sadana e Henley (1987).

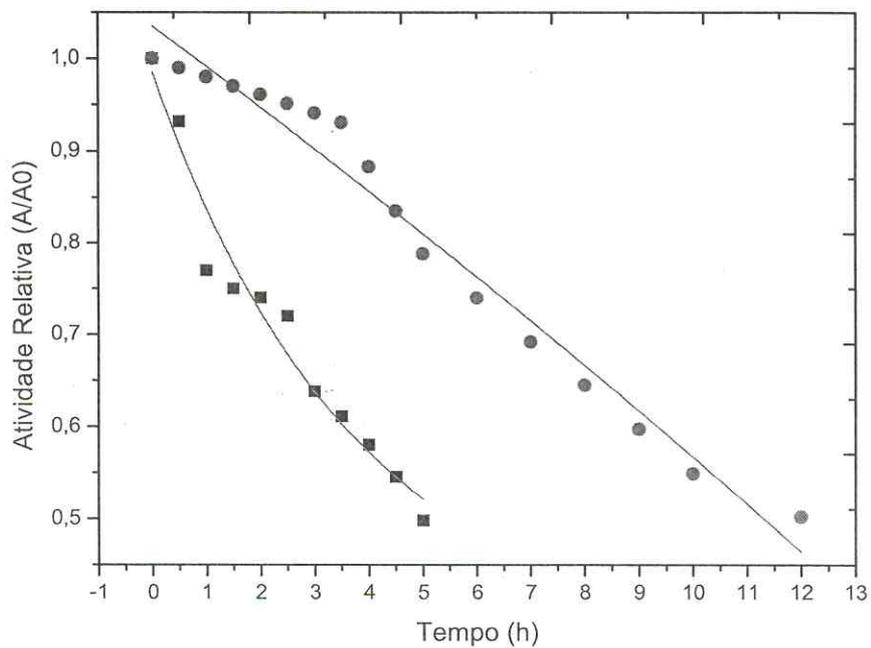


Figura 21. Estabilidade Térmica da L-Al solúvel (■) e imobilizada (◆) a 75°C, no tampão citrato, pH 5,5. As curvas representam a aproximação do modelo de Sadana e Henley (1987).

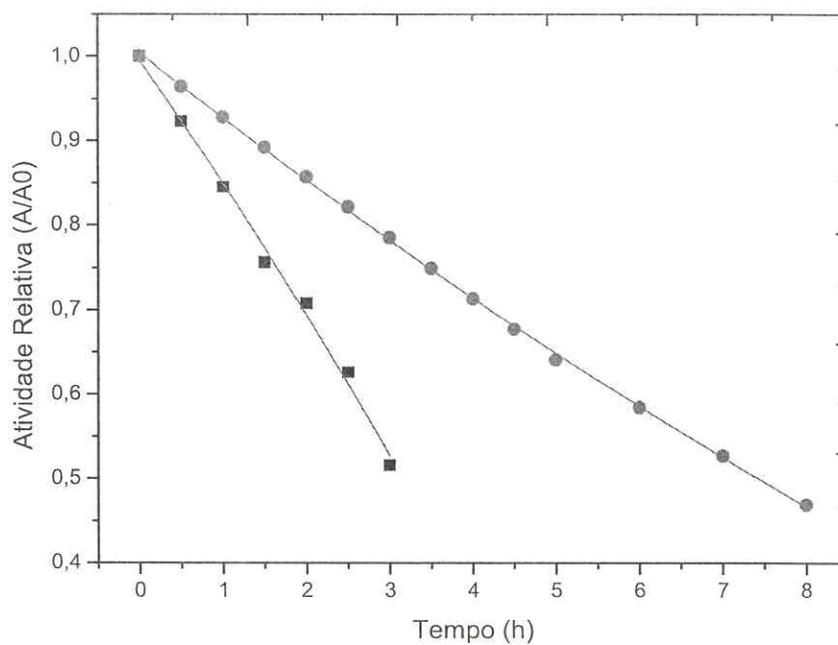


Figura 22. Estabilidade Térmica da L-Al solúvel (■) e imobilizada (◆) a 75°C, no tampão fosfato, pH 7,5. As curvas representam a aproximação do modelo de Sadana e Henley (1987).

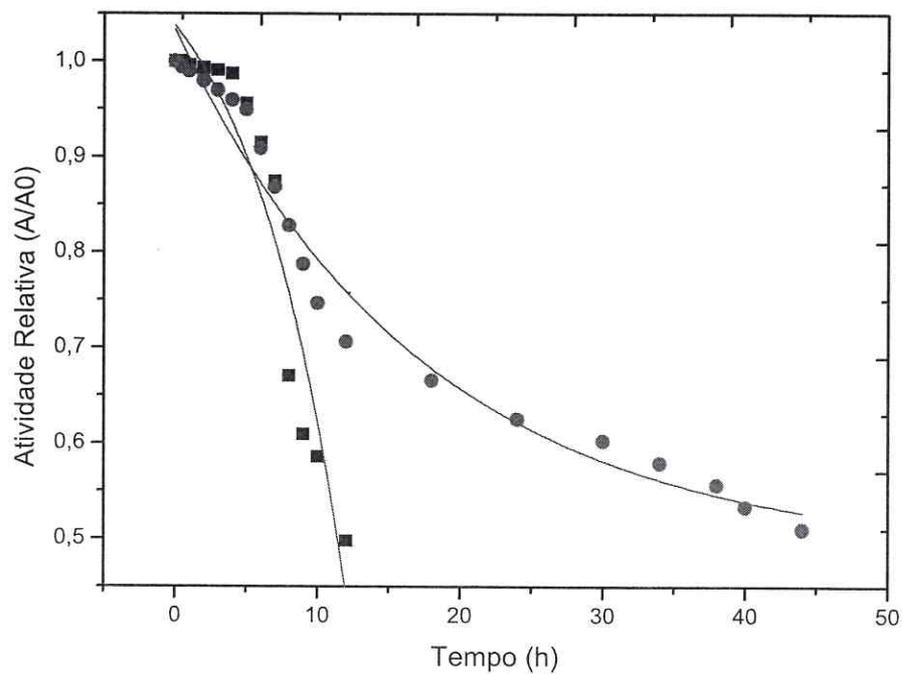
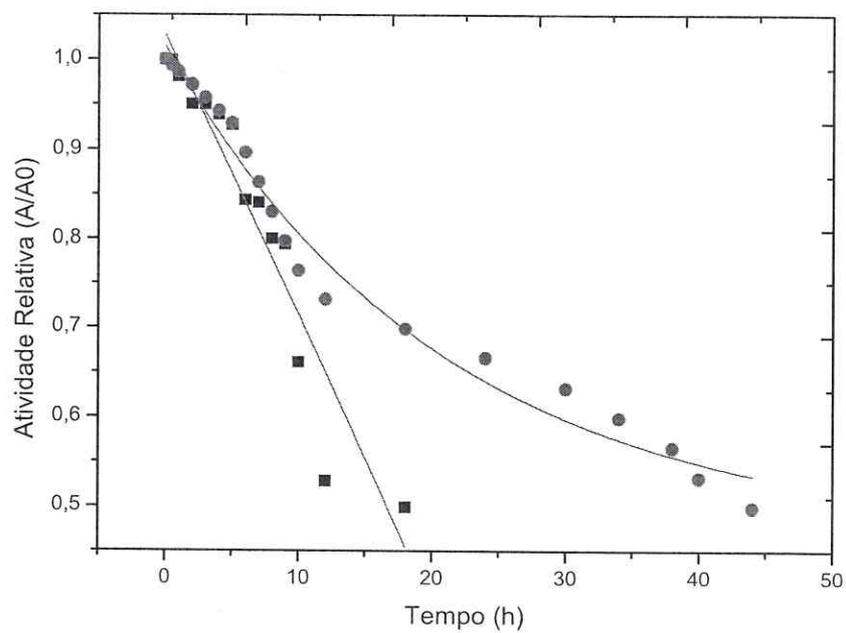


Figura 23. Estabilidade Térmica da L-Al solúvel (■) e imobilizada (◆) a 75°C, no tampão fosfato, pH 8,0. As curvas representam a aproximação do modelo de Sadana e Henley (1987).



A L-arabinose isomerase imobilizada em quitosana-alginato epoxilado, em tampão acetato a pH 5,5 apresentou 12% de desativação térmica nas primeiras 4 horas de exposição à temperatura de 75°C. Nestas condições, apresentou tempo de meia vida de 12h e um fator de estabilidade térmica de 2,40 a mais que a enzima solúvel.

Em tampão citrato, a L-AI solúvel apresentou tempo de meia vida de 3,5 horas enquanto que sua versão imobilizada, de 8 h; o FE, nestas circunstâncias, foi de 2,28 a mais que a L-AI solúvel.

Mediante as condições de pH 7,5 e 8,0 em tampão fosfato, a enzima solúvel mostrou-se mais estável termicamente quando comparados com os resultados em tampão fosfato e acetato em pH 5,5, com tempo de meia vida de 12h e 18h, respectivamente. Já os biocatalisadores nestas mesmas conjunturas, apresentaram 44 h de tempo de meia vida ( $t_{1/2}$ ).

Como o esperado, a enzima imobilizada apresentou maior estabilidade térmica do que em sua forma solúvel, com um fator de estabilidade térmica de 2,44, em tampão fosfato pH 7,5 indicando que imobilização favoreceu a estabilização da enzima, tornando o suporte de quitosana-alginato epoxilado uma alternativa para sua imobilização. Zhang (2011) obtiveram o fator de estabilidade térmica da L-AI imobilizada de *Bacillus licheniformis* de 3,6 e Lim (2008), um fator de estabilidade de 11 para L-AI imobilizada de *Thermotoga neapolitana*.

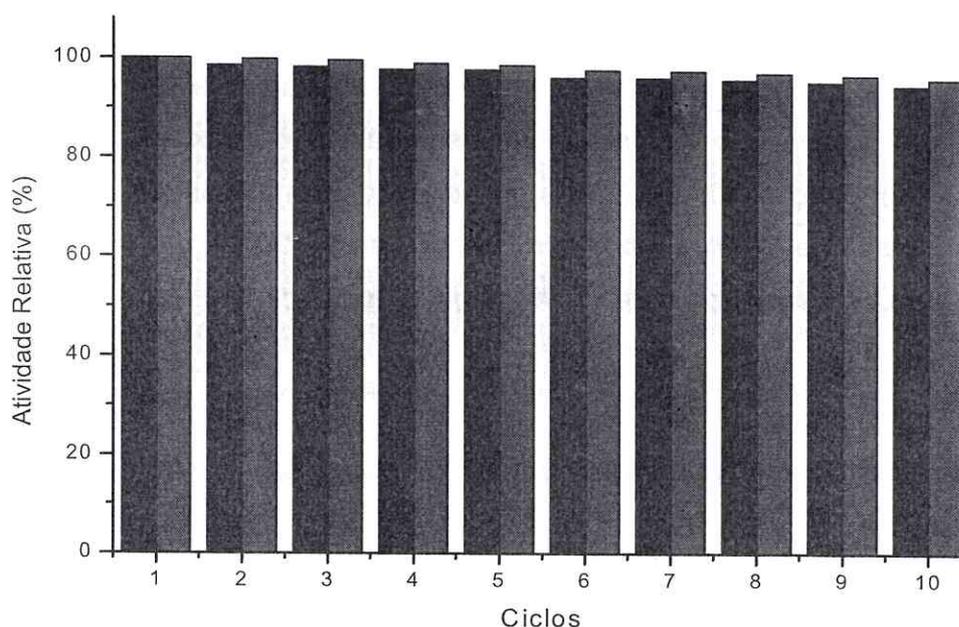
### **3.4 Estabilidade Operacional da L-AI imobilizada**

Consoante os resultados satisfatórios dos parâmetros de imobilização e os fatores de estabilidade térmica, estudou-se a estabilidade operacional da L-AI imobilizada em quitosana-alginato-epoxilado 2,5% através da produção de D-Tagatose. Foram realizadas bateladas consecutivas (10 ciclos) de isomerização em tampão fosfato, pH 7,5 e 8,0 (Figura 25).

Ao avaliar a estabilidade operacional destas isomerizações, observou-se que o derivado obtido a pH 8,0 foi bem mais estável quando comparado ao derivado

obtido a pH 7,5. Contudo, o estudo da estabilidade operacional da isomerização mostrou que ambos os derivados possuem perfis de decaimento semelhantes. Em pH 7,5, a L-AI imobilizada apresentou atividade de 38,60 U de D-tagatose/g de suporte no 1º ciclo e 36,40 U de D-tagatose/g de suporte no 10º ciclo, enquanto que em pH 8,0, a L-AI imobilizada apresentou atividade de 38,61 U de D-tagatose/g de suporte no 1º ciclo e 36,89 U de D-tagatose/g de suporte no 10º ciclo. Não houve perda significativa ( $p \leq 0,05$ ) de atividade durante os 10 ciclos estudados em pH 8,0, confirmando que as ligações enzima-suporte foram suficientemente estáveis conforme afirma Adriano (2008b).

Figura 24. Estabilidade Operacional da L-AI imobilizada a 25°C, em tampão fosfato: (■) pH 7,5 e (▒) 8,0.



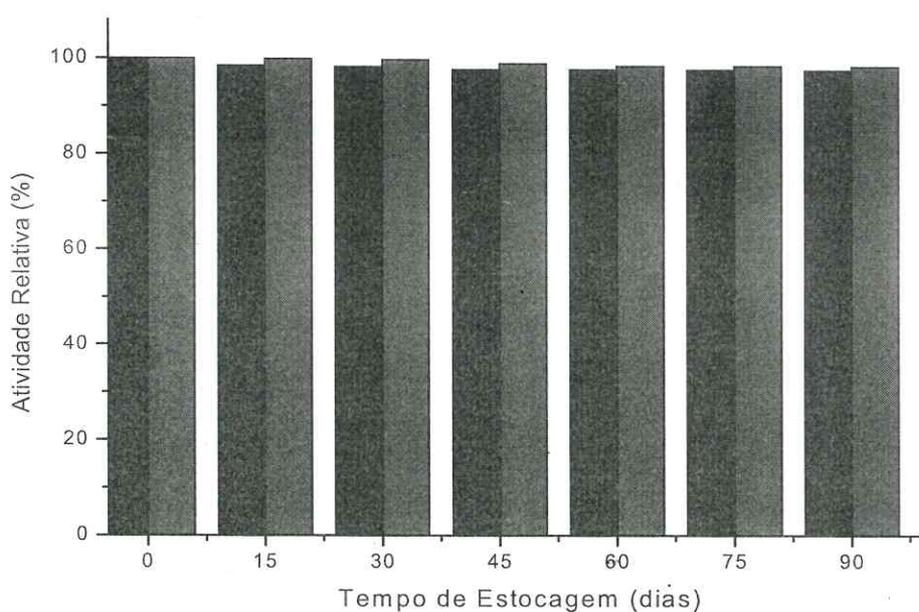
### 3.5 Estabilidade de Estocagem da L-AI imobilizada

No estudo da estabilidade de estocagem a 5°C o suporte mantido em pH 8,0 também apresentou-se sem perda significativa de atividade no período de 90 dias, conforme demonstra a Figura 26. Em pH 7,5, a L-AI imobilizada apresentou

atividade de 38,59 U de D-tagatose/g de suporte no tempo 0 e 37,55 U/g em 90 dias, enquanto que em pH 8,0, a L-Al imobilizada apresentou atividade de 38,67 U de D-tagatose/g de suporte no tempo 0 e 37,96 U de D-tagatose/g em 90 dias de estocagem.

Estas perdas de atividade de 2,69% (pH 7,5) e 1,84% (pH 8,0) durante o tempo de estocagem a 5°C atesta que ambos os derivados obtidos estão aptos a serem armazenados com a finalidade de isomerização da D-Galactose em D-Tagatose.

Figura 25. Estabilidade de Estocagem da L-Al imobilizada a 25°C, nos tampões fosfato pH 7,5 (■) e fosfato 8,0 (■) estudados.



#### 4. CONCLUSÃO

Quitosana-Alginato Epoxilado foi selecionado como suporte de imobilização da *L-arabinose isomerase* para a produção de tagatose em pH 8,0 pois apresentou

maior rendimento de imobilização em tampão fosfato 50 mM após 24h, com 90.21% de atividade recuperada, em temperatura de 25°C, estabilidades térmica de 44h a 75°C, perda de 4,45% na atividade durante o estudo de estabilidade operacional com 10 ciclos e perda de 1,84% da atividade durante 90 dias de estocagem quando comparados com pH mais baixos, em reatores descontínuos. A aplicação industrial para L-AI de *Lactobacillus latis* subsp. *latis* CRL63 continua sendo investigada e a sua estabilidade térmica a altas temperaturas da enzima imobilizada é muito importante.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADRIANO, W. S.; Mendonça, D. B.; Rodrigues, D. S.; Mammarella, E. J.; Giordano, R. L. C. **Improving the Properties of Chitosan as Support for the Covalent Multipoint Immobilization of Chymotrypsin.** *Biomacromolecules*, v. 9, p. 2170-2179, 2008.
- BEADLE, J.R., Saunder, J.P., Wajada, T.J. **Process for manufacturing tagatose.** *US Patent* 5,002,612, 1991.
- BRADFORD, M.M.A. **A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding.** *Analytical Biochemistry*, v.72, p.248-254. 1976.
- CARVALHO, W. Canilha, L., Silva, S.S. **Uso de biocatalisadores imobilizados: uma alternativa para a condução de bioprocessos.** *Revista Analytica*, nº23, p.60-70 Junho/Julho, 2006.
- CHEETHAM, P. S. J., & Wootton, A. N. **Bioconversion of D-galactose into D-tagatose.** *Enzyme and Microbial Technology*, 15, 105–108, 1993.

CHENG, L., Mu, W., Jiang, B. **Thermostable L-arabinose isomerase from *Bacillus stearothermophilus* IAM 11001 for D-tagatose production: gene cloning, purification and characterisation.** *J Sci Food Agric.*, 90: 1327–1333, 2010.

DISCHE, Z.; Borenfreund, E. **A New Spectrophotometric Method for the Detection and Determination of Keto Sugars and Trioses.** *J. Biol. Chem.*, v. 192, p. 583-587, 1951.

HALTRICH, D., Leitner, C., Neuhauser, W., Nidetzky, B., Kulbe, K.D., Volc, J. **A convenient enzymatic procedure for the production of aldose-free D-tagatose.** *Ann. New York Acad. Sci* 864, 295–299, 1998.

IZUMORI, K. **Izumoring: A strategy for bioproduction of all hexoses.** *J Biotechnol* 124:717–722, 2006.

IZUMORI, K., Ueda, Y., Yamanaka, K. **Pentose metabolism in *Mycobacterium smegmatis*: comparison of L-arabinose isomerases induced by L-arabinose and Dgalactose.** *J. Bacteriol.* 133, 413–414, 1978.

JORGENSEN, F., Hansen, O.C., Stougaard, P. **Enzymatic conversion of D-galactose to D-tagatose: heterologous expression and characterisation of a thermostable L-arabinose isomerase from *Thermoanaerobacter mathranii*.** *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 64, 816–822, 2004.

KIM, P. **Current studies on biological tagatose production using L-arabinose isomerase: a review and future perspective.** *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 65(3):243–249, 2004.

KIM, JIM-HA, *et al.* **Characterization of an L-arabinose isomerase from *Bacillus subtilis*.** *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 85:1839–1847, 2010.

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

LEVIN, G.V. *et al.* **Tagatose, the new GRAS sweetener and health product.** *J Med Food* 5:23–36, 2002.

- LI, Y., Zhu, Y., *et al.* **Identification and characterization of a novel *L-arabinose isomerase* from *Anoxybacillus flavithermus* useful in D-tagatose production.** *Extremophiles*, 15:441–450, 2011.
- LIANG, M. *et al.* **Bioconversion of D-galactose to D-tagatose: continuous packed bed reaction with an immobilized thermostable *L-arabinose isomerase* and efficient purification by selective microbial degradation.** *Appl Microbiol Biotechnol*, 93:1469–1474, 2012.
- LIM, B-C, *et al.* **Tagatose Production with pH Control in a Stirred Tank Reactor Containing Immobilized *L-arabinose isomerase* from *Thermotoga neapolitana*.** *Appl Biochem Biotechnol*, 149:245–253, 2008.
- MANZONI, M., Rollini, M., Bergomi, S. **Biotransformation of D-galactitol to tagatose by acetic acid bacteria.** *Process Biochem.* 36, 971–977, 2001.
- MENDES, A. A.; Oliveira, P. C.; Castro, H. F.; Giordano, R. L. C. **Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial.** *Quim. Nova*, v. 34, n. 5, p. 831-840, 2011.
- OH, D. K., Kim, H. J., Ryu, S. A., & Kim, P. **Development of an immobilization method of *L-arabinose isomerase* for industrial production of tagatose.** *Biotechnology Letters*, 23, 1859–1862, 2001.
- OH, D. K. **Tagatose: properties, applications, and biotechnological processes.** *Applied Microbiology and Biotechnology*, 76, 1–8, 2007.
- SADANA, A.; Henley, J.P. **Single-step unimolecular non-first-order enzyme deactivation kinetics.** *Biotechnology and Bioengineering*, v.30, p. 717-723, 1987.
- VASTENAVOND, C.M. Bertelsen, H. *et al.* **Alternative Sweeteners – Fourth Edition.** Chapter 13. Tagatose. 197:220, 2012.
- XU, Z., Li, S., Fu, F., Li, G., Feng, X., Xu, H. **Production of D-tagatose, a Functional Sweetener, Utilizing Alginate Immobilized *Lactobacillus fermentum* CGMCC2921 Cells.** *Appl Biochem Biotechnol*, 1-13. 2011.

ZHANG, Y-W, *et al.* **Alginate immobilization of recombinant *Escherichia coli* whole cells harboring L-arabinose isomerase for L-ribulose production.**

*Bioprocess Biosyst. Eng.*, 33:741–748, 2010.

ZHANG, Y-W, *et al.* **Enhanced activity and stability of *L-arabinose isomerase* by immobilization on aminopropyl glass.** *Appl Microbiol Biotechnol*, 89:1435–1442, 2011.

---

*Capítulo 5*

*Conclusões*

---

## 5. CONCLUSÕES

No desenvolvimento de protocolos de imobilização das enzimas Neutrase e L-arabinose isomerase foram obtidos diversos resultados satisfatórios.

Com relação à enzima Neutrase, os dados obtidos mostram que as matérias-primas oriundas de resíduos agroindustriais (de baixo custo) como a fibra da casca de coco verde, bagaço de caju e quitosana são suportes adequados para a sua imobilização. Melhores resultados de rendimento de imobilização, atividades recuperadas e tempo de meia-vida foram alcançados quando a enzima foi imobilizada em fibra de coco verde bruta. Sobre agentes de ativação, o glutaraldeído demonstra ser o mais adequado, desde que os valores mais elevados de meias-vidas foram alcançados.

Tais resultados também permitiram verificar que há uma influência positiva na ativação de copolímeros e de diferentes métodos de ativação no protocolo de imobilização de Neutrase® em quitosana. Para géis ativados com glutaraldeído, o derivado quitosana 2,5%-glutaraldeído apresentou melhores resultados quanto ao rendimento da imobilização.

Assim, Neutrase® imobilizada em fibra de coco verde natural ativada com glutaraldeído e quitosana 2,5%-glutaraldeído apresentaram-se como biocatalisadores promissores hidrólise de proteínas.

Quanto à enzima L-arabinose isomerase apresentou máxima atividade enzimática obtida a pH 8 a 25°C para enzima solúvel e para a enzima imobilizada o máximo rendimento de imobilização foi no pH 8,0 em tampão fosfato 50 mM após 24 horas, com 90,21% de atividade recuperada, em temperatura de 25°C, estabilidades térmica de 44h a 75°C, perda de 4,45% na atividade durante o estudo de estabilidade operacional com 10 ciclos e perda de 1,83% da atividade durante 90 dias de estocagem quando comparados com pH mais baixos, em reatores descontínuos.

Quitosana-Alginato Epoxilado foi usado como suporte de imobilização por adsorção da *L-arabinose isomerase* para a produção de D-tagatose pois apresentou aplicação industrial viável.

Estudos da produção de D-Tagatose através da L-AI de *Lactobacillus latiss* subsp. *latis* CRL63 continua sendo investigada e sua estabilidade térmica a altas temperaturas da enzima imobilizada é muito importante, assim como sua produção para aplicação em alimentos também deve ser investigada.

Os produtos oriundos destas hidrólises (a partir da Neutrase) e das isomerizações (a partir da L-AI) são de grande importância para a indústria farmacêutica, biotecnológica, médica e de alimentos: peptídeos oriundos da hidrólise de proteínas do soro apresentam grande caracterização funcional antioxidante e antiinflamatória, utilização em alimentos para retardar ou até mesmo evitar oxidação e consequente mudança de cor, sabor e textura, evitando a diminuição do *shelf-life*; já a D-tagatose possui um máximo de 1,5 kcal/g, seu consumo não induz um aumento da glicose no sangue ou os níveis de insulina e ainda estabiliza o nível de glicose, pode ser utilizado como substituto do açúcar, desejável para pessoas com diabetes (alimentos dietéticos), é lentamente convertido em ácidos orgânicos nas placas bacterianas, que não provocam cáries dentárias, e pode ser usada em alimentos prebióticos.

Com isso, a efetivação e a viabilidade econômica das imobilizações das enzimas Neutrase e L-arabinose isomerase em escala industrial através de mais estudos se faz importante visando mensurar a capacidade máxima de imobilização e produção de ambas as enzimas. Como sugestões, estudos da imobilização simultânea de  $\beta$ -galactosidase e L-arabinose isomerase, bem como de Neutrase e Alcalase podem ser mais efetivas dentro de uma indústria de aproveitamento de soro lácteo.